ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES (CHIMIE)

PAR

Michel LEGRAVEREND

SUJET : SYNTHESE ET ETUDE D'ANALOGUES DE NUCLEOSIDES

soutenue le 4 Novembre 1983 devant la Commission d'examen

MM. S. David Président

H. Pacheco Rapporteur

M.R.S.D. Géro

A. Zérial

J.M. Lhoste

E. Bisagni

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES (CHIMIE)

PAR

Michel LEGRAVEREND

SUJET : SYNTHESE ET ETUDE D'ANALOGUES DE NUCLEOSIDES

soutenue le 4 Novembre 1983 devant la Commission d'examen

MM. S. David Président

H. Pacheco Rapporteur

MR ~~S.D.~~ Géro

A. Zérial

J.M. Lhoste

E. Bisagni

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Synthèse Organique de l'Institut Curie à Orsay sous la direction de Monsieur Emile BISAGNI, Maître de Recherche au CNRS.

Je tiens à lui exprimer ici ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli en 1979 dans son laboratoire, de m'avoir confié le sujet de cette thèse, et pour tous les conseils judicieux qu'il m'a donnés tout au long de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur David d'avoir accepté la Présidence du Jury et Monsieur le Professeur Pacheco pour avoir assumé le rôle de rapporteur.

Je remercie très vivement Monsieur Lhoste pour m'avoir initié à certaines subtilités de la résonance magnétique nucléaire, et pour l'enregistrement des spectres .... pendant les week-ends !

J'exprime toute ma gratitude à ~~Monsieur~~ Madame Géro et à Monsieur Zérial pour avoir bien voulu participer au jury de cette thèse.

Enfin, je ne saurais oublier de remercier Martine Croisy, Jacqueline Moron, Marilyse Rautureau, N'Guyen Chi Hung et Christian Rivalle pour l'amitié qu'il m'ont témoignée et pour la très bonne ambiance du laboratoire.

Ce sujet de recherche a bénéficié d'une aide financière de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRL n° 813 013) que je remercie également.

SUMMARY

On model nucleosides which are already analogues of adenosine (formycin, tubercidin, aristeromycin, and puromycin) we have carried out further modifications or new structural change associations with the purpose of obtaining less toxic compounds than the models.

This research allowed us to observe blocked syn conformations in some carbocyclic analogues of tubercidin. On the other hand, we have discovered a new heterocyclic rearrangement in the aza-indole series.

We have shown that replacement of the ribose of tubercidin by a cyclopentane or a pyranose decreases the toxicity to a large extend as compared to the model (tubercidin) and can, in some instances, lead to specific antiviral compounds.

"On doit toujours faire des expériences. Car il n'y a pas de commune mesure entre ce que l'on perd en n'essayant pas et ce que l'on perd en ne réussissant pas ; car en n'essayant pas nous rejetons la possibilité d'un bénéfice immense ; en ne réussissant pas nous ne faisons que provoquer la perte d'un petit peu de travail humain".

Francis BACON, Novum Organum
1620

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

Bibliographie 9

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A) Aperçu des travaux antérieurs sur les C-nucléosides 12

B) Méthodes de synthèse des nucléosides carbocycliques 18

C) Voies d'accès aux nucléosides dérivés des pyrrolo [2,3-d] pyrimidines 21

Bibliographie 24

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS DE NOS PROPRES TRAVAUX

Chapitre I :

C-nucléosides dérivés des s-triazolo [4,3-b] pyridazines 28

Chapitre II :

Essai d'obtention de C-nucléosides dérivés des s-triazolo [4,3-d] triazines 1,2,4 35

Chapitre III :

Analogues carbocycliques de nucléosides

1) Synthèse et activité biologique 40

2) Etude de la conformation par RMN 47

Chapitre IV :

Essais d'obtention de nucléosides carbocycliques aza-7 indoliques à partir des aza-5 indoles, suivant un nouveau réarrangement 58

Chapitre V :

Synthèse d'un nouvel analogue carbocyclique de la puromycine. 69

Chapitre VI :

Etude de nouveaux pseudonucléosides 85

CONCLUSION 109

SYNTHESE ET ETUDE D'ANALOGUES

DE NUCLEOSIDES

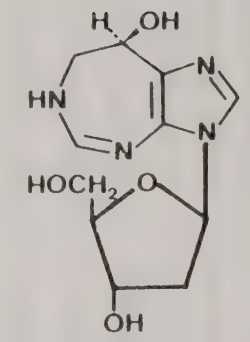
INTRODUCTION

Les nucléosides sont des entités moléculaires fondamentales de tout système biologique puisque, dans les acides nucléiques (ADN et ARN) leur séquence correspond à l'information génétique. Ils sont constitués d'une base : la thymine (dans l'ADN), l'uracile (dans l'ARN), la cytosine, l'adénine ou la guanine et d'un sucre : le 2'-désoxyribose (dans l'ADN) ou le ribose (dans l'ARN). En plus de ces nucléosides fondamentaux, les acides nucléiques contiennent des nucléosides modifiés (mineurs) (nucléosides méthylés, pseudouridine, thiouridine, N^6-(Δ^2-isopentenyl)2-methyl thio-adénosine, etc) qui peuvent jouer un rôle important de régulation des fonctions biologiques (1).

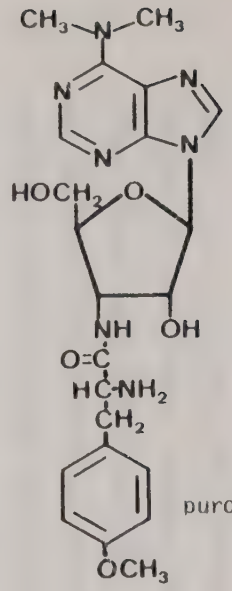
Par ailleurs, de très nombreux analogues naturels des nucléosides fondamentaux mentionnés plus haut ont été découverts, à l'état libre, dans des extraits de différents microorganismes. Ce sont en général des antibiotiques à spectre antimicrobien étroit mais certains d'entre eux possèdent des propriétés antivirales et/ou antitumorales et inhibent spécifiquement certaines enzymes pouvant ainsi servir de sonde biochimique pour étudier le métabolisme cellulaire (Tableau I) (2,3).

La réactivité chimique des nucléosides dans les acides nucléiques constitue également un thème de recherche important (réactivité vis-à-vis des agents alkylants ou intercalants, de la lumière ultraviolette...) (4).

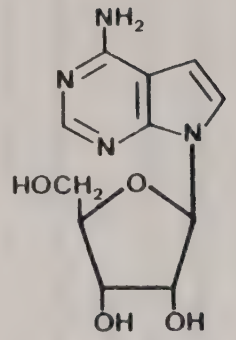
De très nombreuses enzymes sont impliquées dans la biosynthèse et l'utilisation des nucléotides, précurseurs directs de la synthèse des acides nucléiques. Ces enzymes constituent autant de cibles susceptibles d'être inhibées par certains analogues structuraux de nucléosides qui deviennent ainsi de véritables "antimétabolites" (5-13). Ces quelques considérations expliquent l'immense intérêt porté à la chimie et à la biochimie des nucléosides. De très nombreuses équipes de recherche se consacrent d'ailleurs à la chimie des nucléosides dans le but d'augmenter l'activité biologique (antivirale, antitumorale, inhibitrice d'enzyme...) de certains analogues tout en diminuant leur toxicité, afin d'acquérir des produits utilisables en chimiothérapie anticancéreuse et/ou antivirale chez l'Homme. Cette recherche a déjà permis d'obtenir un bon nombre d'analogues présentant des propriétés biologiques ou biochimiques extrêmement intéressantes (Tableau II). Certains auteurs considèrent même que l'étude de cette classe de produits devrait, dans les prochaines années, permettre d'acquérir des nouvelles drogues actives sur de nombreuses maladies d'origine virale qui résistent encore à toute chimiothérapie.



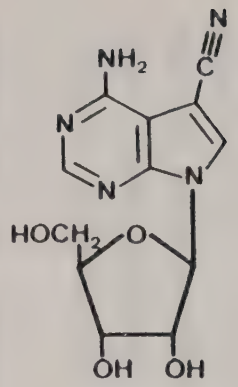
désoxy-2'coformycine



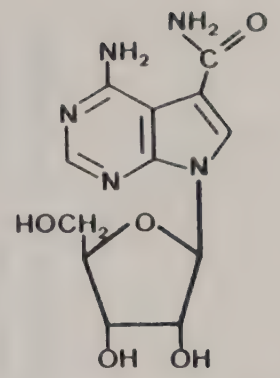
puromycine



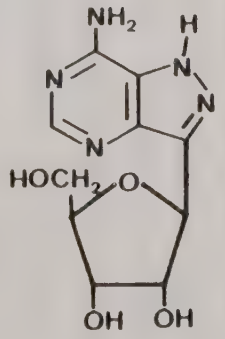
tubercidine



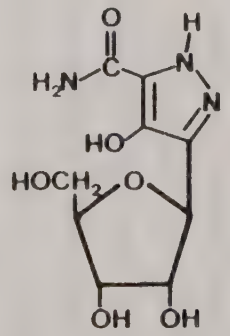
toyocamycine



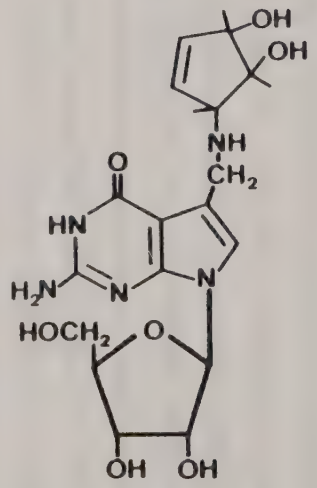
sangivamycine



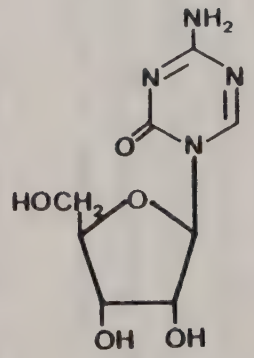
formycine



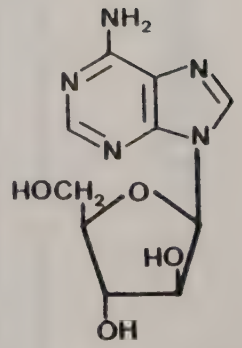
pyrazofurine



nucléoside Q



aza-5 cytidine

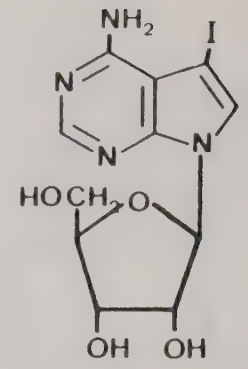


β-D arabino-furannosyl-9 adénine

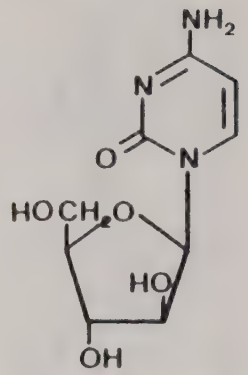
TABLEAU I. Structures de quelques nucléosides naturels

TABLEAU I

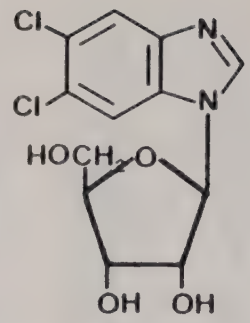
Nucléoside (Microorganisme producteur)	Propriétés biologiques principales (références)
désoxy-2'coformycine (Streptomyces antibioticus)	- Inhibiteur de l'adénosine désaminase d'érythrocyte humain (K_I = 2,5 x 10^{-12} M), le plus puissant connu - Immunosuppresseur - Antileucémique chez l'homme en phase I (étude clinique réalisée au NCI, USA). (14,15)
puromycine (Streptomyces alboniger)	- Antibiotique - Inhibiteur de la synthèse protéique par décrochage prématuré des chaînes polypeptidiques naissantes de peptidyl-puromycine ; a permis d'élucider le mécanisme de la formation de la liaison peptidique sur le ribosome - Antitumoral. (3,16,17)
tubercidine (Streptomyces tubercidicus)	- Cytotoxique - Inhibiteur de la synthèse des acides nucléiques dans les cellules KB. (3)
toyocamycine (Streptomyces toyocaensis)	- Cytotoxique - Antitumoral - Inhibiteur de la maturation de l'ARN ribosomal. (3)
sangivamycine (Streptomyces rimosus)	- Cytotoxique - Antitumoral sur cellules HeLa, L1210 et P388 - Sélectionné pour des études cliniques. (3)
nucléoside Q (E.coli, cellules animales et végétales)	- Localisé dans la première position de l'anticodon de très nombreux ARN de transfert - Fonction inconnue. (3)
formycine A (Norcardia interforma et Streptomyces lavendulae)	- Inhibiteur spécifique de la synthèse de ARN 5S et 4S - Antitumoral. (2,18)
pyrazofurine (Streptomyces candidus)	- Antitumoral - Antiviral - Inhibiteur de l'orotidylate decarboxylase (K_I = 10^{-9} M) (après conversion en nucléotide 5'-phosphate). (3,12,19,20)
aza-5 cytidine (Streptomyces ladakanus)	- Antitumoral, actif sur des tumeurs humaines (AML, CML) - Inhibiteur de la synthèse des macromolécules (ARN, ADN, protéines). (3,20)
Adénine arabinoside (Streptomyces antibioticus)	- Antiviral (Herpes) - Antitumoral - Inhibiteur des ADN polymérases α (K_I = 3 µM) et β (K_I = 45 µM) après conversion en nucléotide triphosphate. (3,21,22,23)



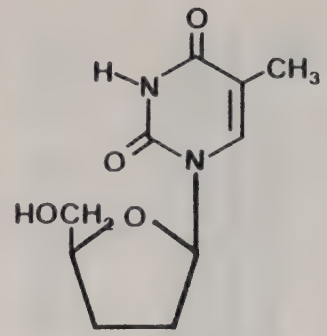
iodo-5 tubercidine



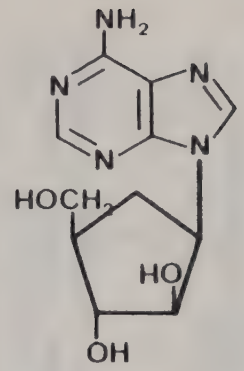
cytosine arabinoside



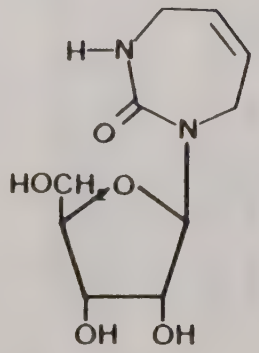
β-D-ribofurannosyl-1 dichloro-5,6 benzimidazole



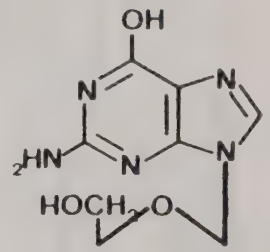
désoxy-3' thymidine



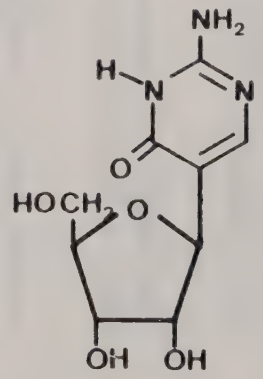
cyclaradine (analogue carbocyclique de l'Ara A)



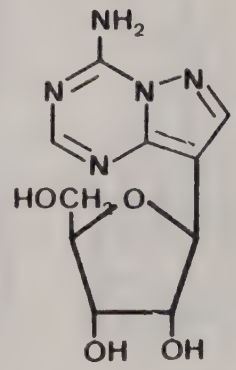
Nucléoside de l'urée cyclique



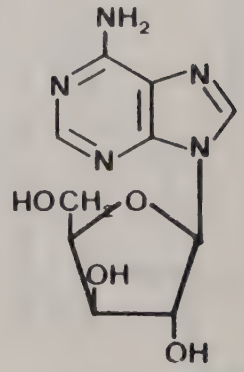
acycloguanosine (ou acyclovir)



pseudoisocytidine



APTR



β-D-xylofurannosyl-9 adénine

TABLEAU II. Structures de quelques nucléosides de synthèse

TABLEAU II (suite)

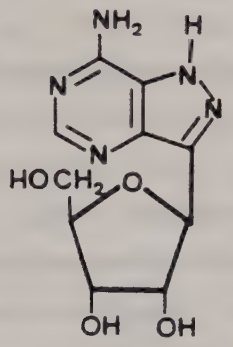
Nucléoside	Propriétés biologiques principales (références)
iodo-5 tubercidine	- Inhibiteur de l'adénosine kinase (24,25)
cytosine arabinoside	- Antitumoral, actif sur la leucémie P815 (souris) et sur des leucémies humaines (AML) - Antiviral (Herpes) - Inhibiteur de la DNA polymerase α ($K_I = 4 \times 10^{-6}$ M) et β ($K_I = 32 \times 10^{-6}$ M) après conversion en ara CTP. (21,26,27)
β-D ribofurannosyl-1 dichloro-5,6 benz-imidazole	- Inhibiteur de la synthèse de l'ARN messager - Stimule la production d'interféron par le poly(I).poly(C). (28)
désoxy-3'thymidine	- Inhibiteur spécifique de l'ADN polymérase ($K_I = 35 \times 10^{-9}$M) après conversion en nucléotide triphosphate. (29)
nucléoside de l'urée cyclique β-D ribofurannosyl-1 tetrahydro-1,3,4,7-2H-diazepine-1,3-one-2	- Inhibiteur spécifique de la cytidine désaminase de foie humain ($K_I = 2.5 \times 10^{-8}$ M) (le plus puissant connu à ce jour). (30)
cyclaradine	- Antiviral (ED_{50} = 9 µg/ml sur HSV type I). (21,31)
acyclovir	- Antiviral (ED_{50} = 0,02 µg/ml sur HSV type I) - Etude clinique en cours. (32)
pseudoisocytidine	- Antitumoral (ILS = 145 sur la leucémie P815 de la souris) - A été sélectionné pour des études cliniques chez l'homme (phase I) . (33,34)
"APTR" amino-4-β-D-ribo-furannosyl-8 pyrazolo [1,5-a]-1,3,5-triazine	- Antitumoral (ED_{50} = 0,1 µg/ml sur cellules L1210, ED_{50} = 0,2 µg/ml sur cellules P815) (ILS = 100 sur la leucémie L1210 de la souris) (35,36)
xylosyladénine	- Antitumoral - Inhibiteur de la synthèse de l'ARN nucléaire - Inhibiteur des phosphorylation des protéines non histoniques. (37,38,39)

L'étude des relations entre la structure et l'activité biologique de ce type de substance naturelle reste donc un sujet d'actualité. Dans de nombreux cas, elle nécessite la mise en oeuvre de méthodes appropriées de chimie organique.

Afin de définir le contexte dans lequel nos travaux se sont inscrits, la première partie de cette thèse sera donc consacrée à une revue succincte des principales méthodes qui permettent d'accéder à ce type de structure.

Dans la seconde partie, nous exposerons les résultats des travaux réalisés sur la synthèse et l'étude d'analogues de nucléosides nouveaux apparentés à trois familles de nucléosides naturels :

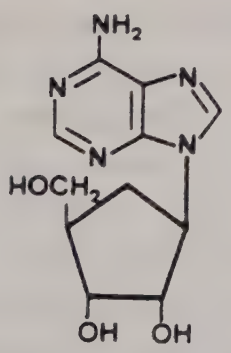
- les *C*-nucléosides qui se caractérisent par une liaison carbone-carbone entre la base et le sucre (au lieu d'une liaison azote-carbone observée généralement) dont la formycine est un exemple :



Formycine

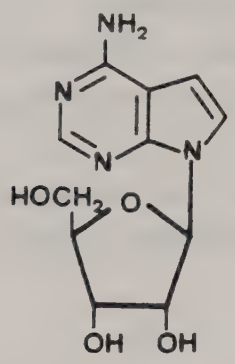
Nos essais de synthèse de dérivés des as-triazolo-triazines, ainsi que l'étude structurale réalisée à cette occasion se rattachent à ce chapitre.

- les nucléosides carbocycliques dans lesquels l'oxygène ribofurannosique a été "remplacé" par un groupement méthylène : l'aristéromycine en est le prototype.



Aristeromycine
Nucléoside antibiotique (streptomyces citricolor) Inhibiteur de la S-adenosyl-homocysteine hydrolase (K_I = 5 x 10^{-9} M) (40)

- les nucléosides comportant une pyrrolo [2,3-d] pyrimidine à la place de la purine habituelle correspondent à une modification de la base. Ces nucléosides peuvent être considérés comme des analogues de l'adénosine où l'azote 7 de la purine a été "remplacé" par un carbone, comme dans le cas de la tubercidine.



Tubercidine

La mise en évidence d'un nouveau réarrangement des aza-5 indoles en leurs isomères aza-7, dont l'étude a été réalisée pour tenter d'accéder à une didéaza-aristéromycine, s'inscrit dans ce contexte.

Enfin, la synthèse d'un nouvel analogue de la puromycine et l'obtention de pseudo nucléosides inédits qui comportent à la fois une base modifiée (comme dans la tubercidine) et un carbocycle fonctionnalisé (à la place du sucre) complètent ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1) Söll, D., Science 173, 293 (1971) ; Bergquist, P.C. and Matthews, R.E.I., Biochem. J. 85, 305 (1962) ; Hall, R.H., Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 10, 57 (1970). Nishimura, S., Dans : "Transfer RNA", Eds. S. Altman, MIT Press, p. 169 (1978).
2) Suhadolnik, R.J., Nucleoside Antibiotics, John Wiley & Sons, New York (1970).
3) Suhadolnik, R.I., Nucleoside as Biological Probes, John Wiley & Sons, New York (1979).
4) Lawley, P.D., Orr, D.J. and Jarman, M., Biochem. J. 145, 73 (1975) ; Abbott, P.J. and Saffhill, R., Biochem. Biophys. Acta 562, 51 (1979) ; Jouin, P., Thèse de Doctorat Es-Sciences Physiques, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay (1979).
5) Miller, R.L., Adamczyk, D.L. and Miller, W.H., J. Biol. Chem. 254, 2339 (1979).
6) Miller, R.L., Adamczyk, D.L., Miller, W.H., Koszalka, G.W., Rideout, J.L., Beacham, L.M., Chao, E.Y., Haggerty, J.J., Krenitsky, T.A. and Elion, G.B., J. Biol. Chem. 254, 2346 (1979).
7) Daddona, P.E. and Kelley, W.N., J. Biol. Chem. 253, 4617 (1978).
8) Adamson, R.H., Zaharevitz, D.W. and Johns, D.G., Pharmacol. 15, 84 (1977).
9) Plunkett, W. and Cohen, S.S., Cancer Res. 35, 1547 (1975).
10) Stoeckler, J.D., Cambo, C. and Parks, R.E. Jr, Biochemistry 19, 102 (1980).
11) Orengo, A., J. Biol. Chem. 224, 2204 (1969).
12) Cadman, E., Eiferman, F., Heimer, R. and Davis, L., Cancer Res. 38, 4610 (1978).
13) Murray, A.W., Elliott, D.C. and Atkinson, M.R., Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 10, 87 (1970).
14) Agarwal, R.P., Spector, T. and Parks, R.E., Biochem. Pharm. 26, 359 (1977).
15) Poplack, D.G., Sallan, S.E., Rivera, G., Holcenberg, J., Murphy, S.B., Blatt, J., Lipton, J.M., Venner, P., Glaubiger, D.L., Ungerleider, R. and Johns, D., Cancer Res. 41, 3343 (1981).
16) Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 585 (1964).
17) Traut, R.R. and Monro, R.E., J. Mol. Biol. 10, 63 (1964).
18) Abelson, H.T. and Penman, S., Biochim. Biophys. Acta 312, 292 (1973).
19) Worzalla, J.F. and Sweeney, M.J., Cancer Res. 40, 1482 (1980).
20) Martelo, O.J., Brown, G.O. and Petruska, P.J., Cancer Treat. Rep. 65, 237 (1981).
21) Shannon, W.M. and Schabel, F.M. Jr, Pharmac. Therap. 11, 263 (1980).
22) Okura, A. and Yoshida, S., J. Biochem. 84, 727 (1978).
23) Ono, K., Ohashi, A., Yamamoto, A., Matsukage, A., Takahasi, T., Saneyoshi, M. and Ueda, T., Cancer Res. 39, 4673 (1979).

24) Henderson, J.F., Paterson, A.R.P., Caldwell, I.C., Paul, B., Chan, M.C. and Lau, K.F., Cancer Chemother. Rep., Part 2, 3, 71 (1972).

25) Wotring, L.L. and Townsend, L.B., Cancer Res. 39, 3018 (1979).

26) Kreis, W., Chemistry, Biology and Clinical Uses of Nucleoside Analogs. An. New York Ac. Science 255, 244 (1975).

27) Yoshida, S., Yamada, M. and Masaki, S., Biochim. Biophys. Acta 477, 144 (1977).

28) Sehgal, P.B. and Tamm, I., Virology 92, 240 (1979).

29) Ono, K., Ogasawara, M. and Matsukage, A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 1255 (1979).

30) Liu, P.S., Marquez, V.E., Driscoll, J.S. and Fuller, R.W., J. Med. Chem. 24, 662 (1981).

31) Vince, R. and Daluge, S., J. Med. Chem. 20, 612 (1977).

32) Elion, B.G., Furman, P.A., Fyfe, J.A., De Miranda, P., Beauchamp, L. and Schaeffer, H.J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5716 (1977).

33) Burchenal, J.H., Ciovacco, K., Kalaher, K., O'Toole, T., Kiefner, R., Dowling, M.D., Chu, C.K., Watanabe, K.A., Wempen, I. and Fox, J.J., Cancer Res. 36, 1520 (1976).

34) Woodcock, T.M., Chou, T.C., Tan, T.C., Sternberg, S.S., Philips, F.S., Young, C.W. and Burchenal, J.H., Cancer Res. 40, 4243 (1980).

35) Tam, S.Y.K., Klein, R.S., Wempen, I. and Fox, J.J., J. Org. Chem. 44, 4547 (1979).

36) Fox, J.J., Watanabe, K.A., Klein, R.S., Chu, C.K., Tam, S.Y.K., Reichman, U., Hirota, K., Wempen, I., Lopez, C. and Burchenal, J.H.. Les Colloques de l'INSERM, Nucléosides, Nucléotides 81, 241 (1978).

37) Ellis, D.B. and Le Page, G.A., Mol. Pharmacol. 1, 231 (1965).

38) Peale, A.L. and Glazer, R.I., Biochem. Pharmacol. 27, 2543 (1978).

39) Legraverend, M. and Glazer, R.I., Mol. Pharmacol. 14, 1130 (1978).

40) Guranowski, A., Montgomery, J.A., Cantoni, G.L. and Chiang, P.K., Biochemistry 20, 110 (1981).

PREMIERE PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A) Aperçu des travaux antérieurs sur les C-nucléosides

Dans les nucléosides d'intérêt biologique, le sucre est le plus souvent un ribose (de la série D) (voir Tableaux I et II de l'Introduction). C'est pourquoi, nous limiterons cette discussion aux C-nucléosides dérivés du ribofurannose.

La méthode la plus utilisée pour accéder à ces C-nucléosides consiste à construire l'hétérocycle voulu, en une ou plusieurs étapes, sur un "C-glycosyl" fonctionnalisé sur sa position 1. Cette stratégie permet d'obtenir des analogues de nucléosides qui comportent un D-ribofurannose optiquement pur si l'on utilise le D-ribopyrannose commercial comme composé de départ.

Une autre stratégie consiste à construire le nucléoside à partir du furanne et d'un diénophile convenablement choisi, par une réaction de Diels-Alder. Cette dernière méthode conduit évidemment au mélange des isomères optiques D et L du ribose difficiles à séparer. Toutefois, la résolution des isomères optiques est possible (14).

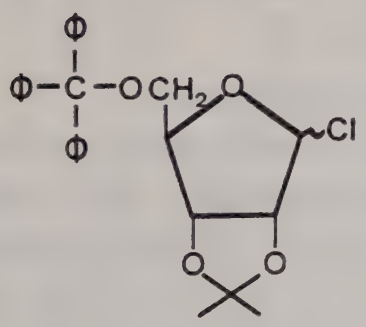
Ces stratégies sont très générales et seraient applicables à d'autres sucres en C5 (xylose, arabinose, lyxose...) voire à des sucres en C6 comme le rhamnose.

a) Formation de la liaison carbone-carbone par greffage des groupements fonctionnels voulus sur le carbone anomérique du D ribose

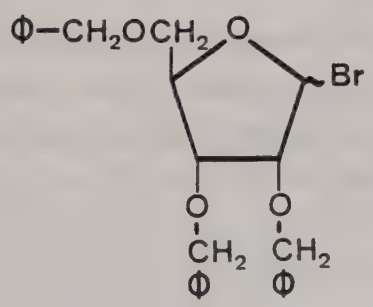
Nous examinerons successivement trois types d'intermédiaires :

- les propiolates de type **3** ou **4**
- les acétonitriles de type **9**
- les nitriles de type **16**

Les halogénures du D-ribofurannose dont les fonctions alcools ont été préalablement protégées (**1** ou **2**) peuvent être facilement convertis en dérivés propiolates

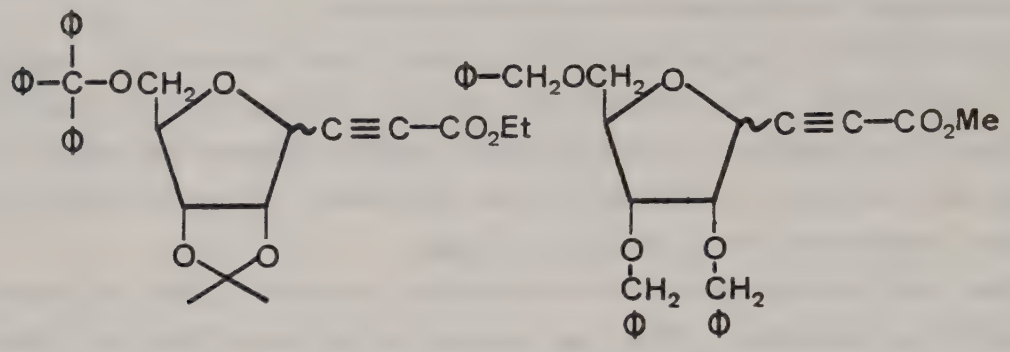


1



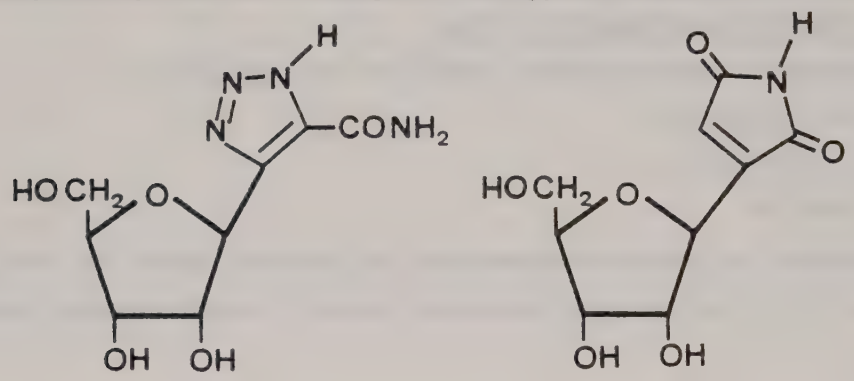
2

par condensation sur l'acétylure d'argent du propiolate d'éthyle ou de méthyle conduisant respectivement au [(O-isopropylidène-2,3) O-trityl -5α,β-D-ribofurannosyl]-3 propiolate d'éthyle **3** ou au dérivé méthylé **4** (les isomères α et β sont séparables par chromatographie) (1,2).



3 **4**

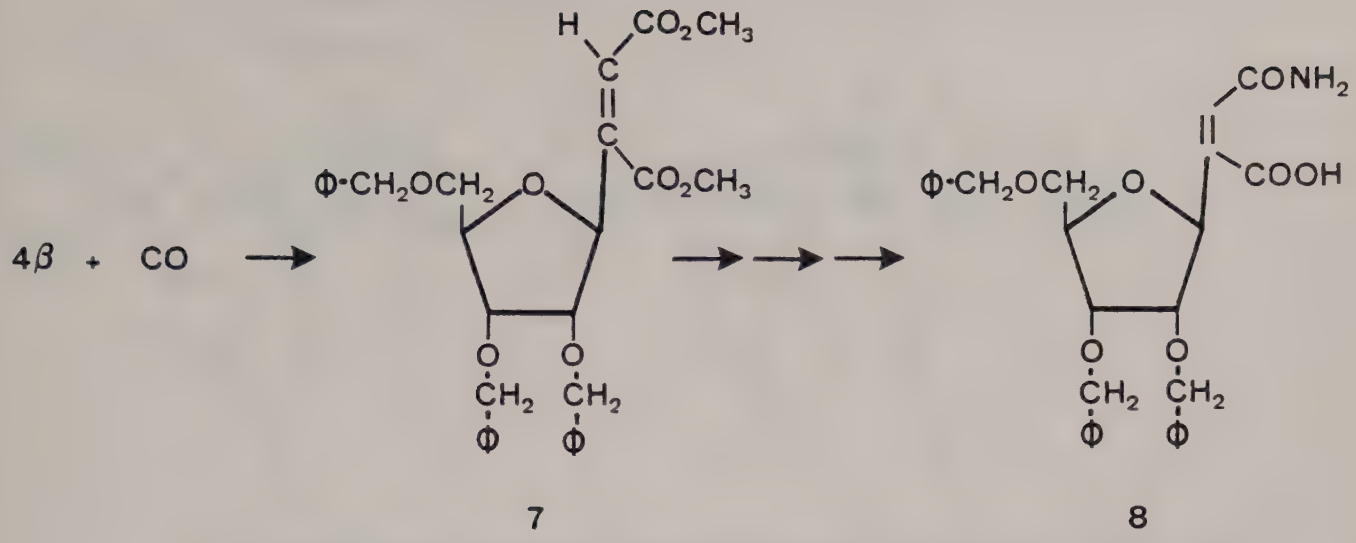
Les intermédiaires du type **3** ou **4** ont été largement utilisés. La cycloaddition 1,3 dipolaire de l'azide de triméthylsilyle sur l'intermédiaire acétylénique **3** a permis par exemple de synthétiser l'analogue **5** de la pyrazofurine (1).



5 **6**

Quant au dérivé **4** , il a permis d'accéder à la showdomycine **6** (3).

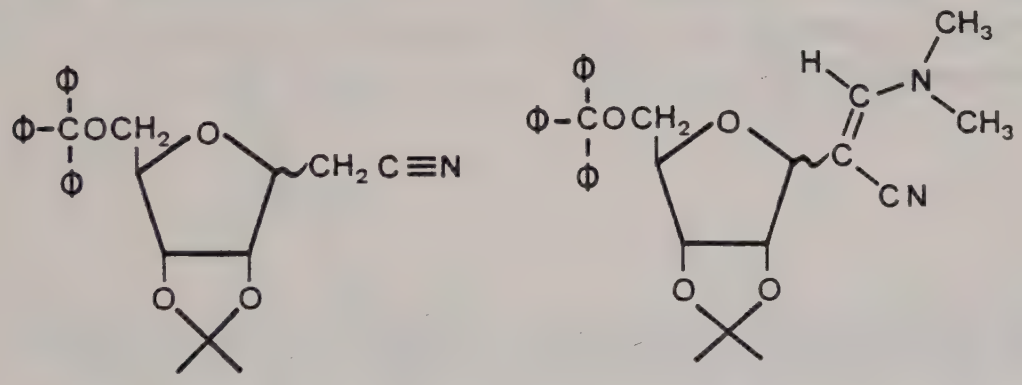
En effet, **4**β par une réaction de Heck (méthanol, 2 atmosphères de monooxide de carbone, chlorure de palladium, chlorure mercurique) conduit à **7** (80 %). Après conversion en acide maléique (KOH,H_2O), ce dernier fournit l'anhydride (anhydride acétique) lui-même converti en acide maléamique **8** (NH_3). Après cyclisation de **8** (chlorure d'acétyle, DMF) et déprotection (BCl_3, CH_2Cl_2), on obtient la showdomycine **6** (3).



7 8

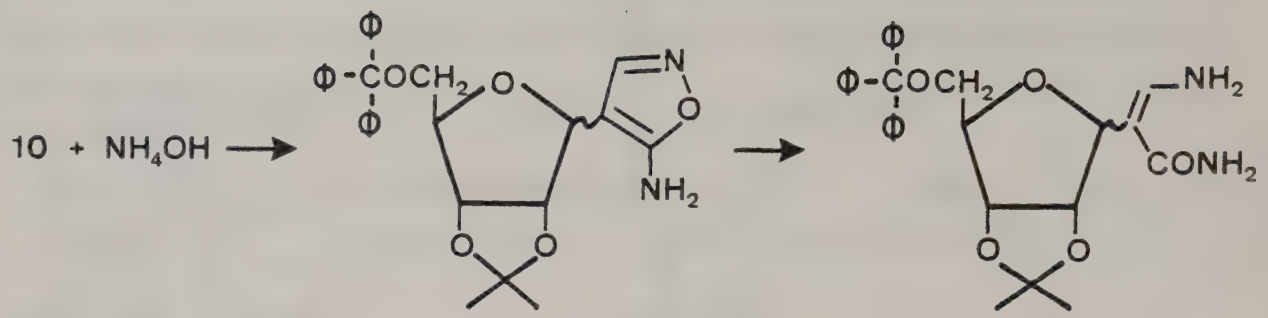
L'intermédiaire **3** a également permis d'effectuer la synthèse d'un autre nucléoside important par ses propriétés biologiques (voir Tableau II), l'"APTR" (amino-7-pyrazolo-s-triazine-riboside) (4).

Un autre intermédiaire clé (6,7) des synthèses de C-nucléosides est l'acétonitrile **9** ($\alpha + \beta$) qui a permis de synthétiser **15.** Il est obtenu à partir du O-isopropylidène-2,3 O-trityl-5 -D-ribofurannose et de cyanométhylène triphényl phosphorane (Φ_3P = CH-CN) selon une réaction de type Wittig (5). Sa formylation par le bis(diméthylamino)-tert-butyloxyméthane dans le DMF conduit au mélange α, β -10 séparables par chromatographie.



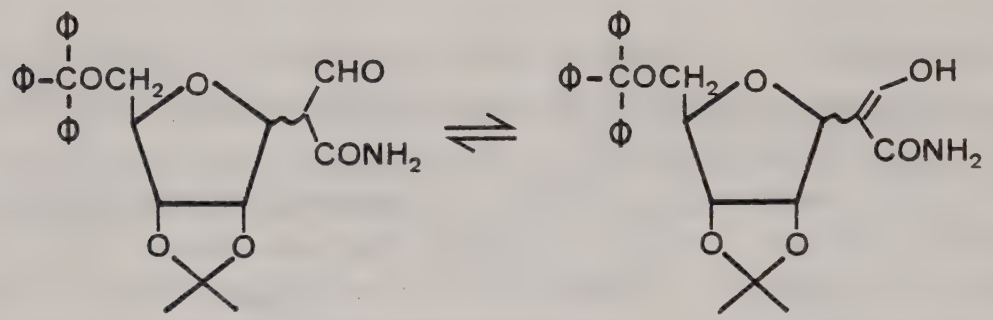
9 10

L'énamine **10** réagit avec l'hydroxylamine dans le DMF pour donner l'isoxazole **11.** Celui-ci est hydrogéné sur platine dans le diméthoxyéthane pour donner l'aminoacrylamide qui, par l'hydrolyse de sa fonction énamine primaire (HCl



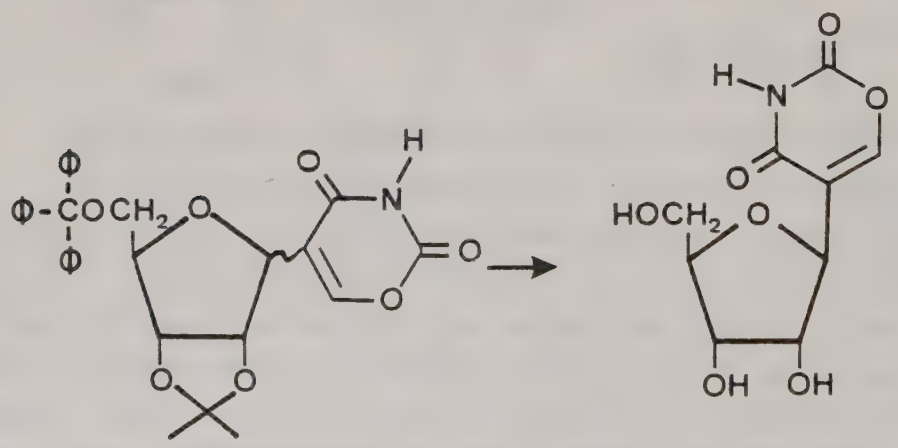
11 12

aqueux/$CHCl_3$) conduit à un mélange de formes tautomères (aldéhyde/enol) **13**.



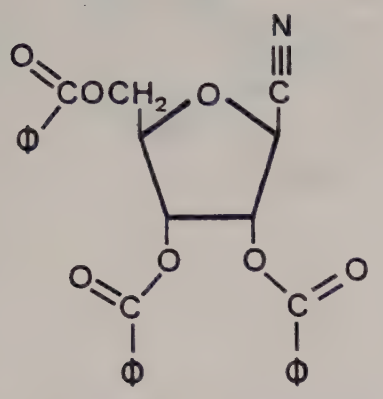
13

Les composés **13** réagissent avec le N,N'-carbonyldiimidazole dans le diméthoxyéthane, en présence d'une base pour fournir la 1,3-oxazine **14** qui, après déprotection et séparation des anomères α et β donne l'oxazinomycine **15** (6).

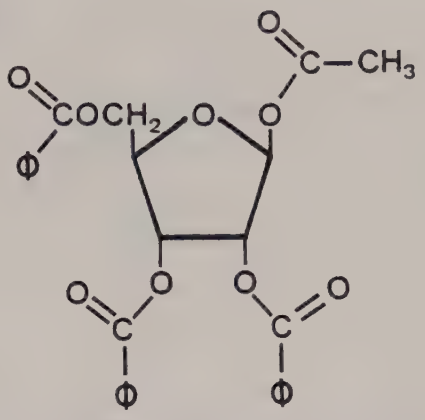


14 15

Enfin, le dernier intermédiaire que nous mentionnerons est le cyano-1 tri-O-benzoyl-D-ribofurannose **16.**

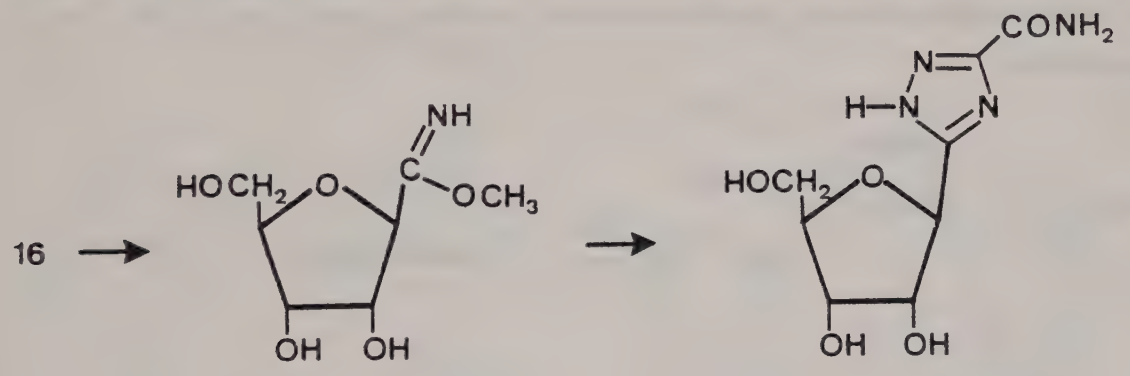


16



17

Il est obtenu à partir du O-acétyl-1 tri-O-benzoyl-2,3,5 ribofurannose **17** par bromation en 1 par l'acide bromhydrique dans le toluène et cyanuration directe par réaction avec le cyanure mercurique dans le nitrométhane (8,9). Un exemple d'utilisation de l'intermédiaire **16** est fourni par la synthèse du C virazole **19** en 1977 (10,11) par réaction de l'hydrazide oxamique sur **18.**

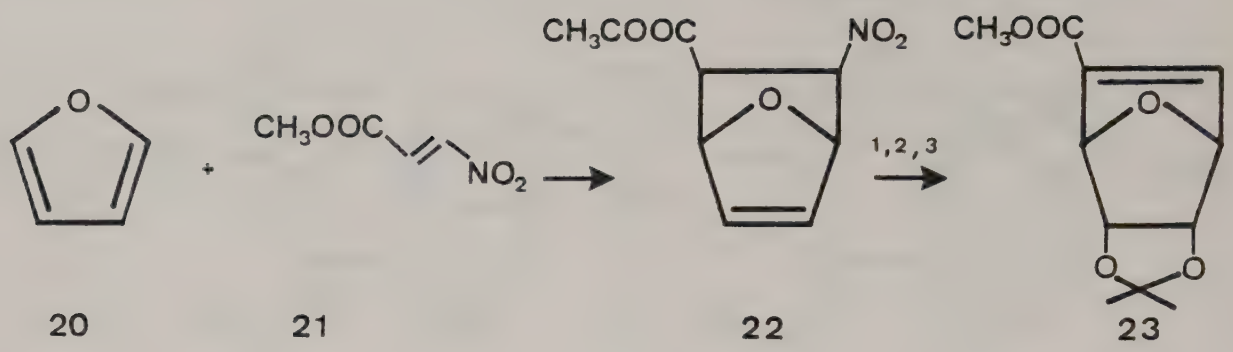


18 **19**

b) Synthèses totales de C-nucléosides à partir d'un précurseur non carbohydraté

Elles sont réalisées à partir du furanne ou d'un dérivé de ce dernier. Ce sont des synthèses stéréocontrolées. Nous distinguerons cependant deux classes : 1) les synthèses selon Diels-Alder par réaction du furanne sur un diénophile ; 2) les synthèses partant du furanne et de tétrabromoacétone.

1) Le méthyl-β-nitroacrylate **21** réagit sur le furanne **20** selon une réaction de Diels-Alder (12,13).



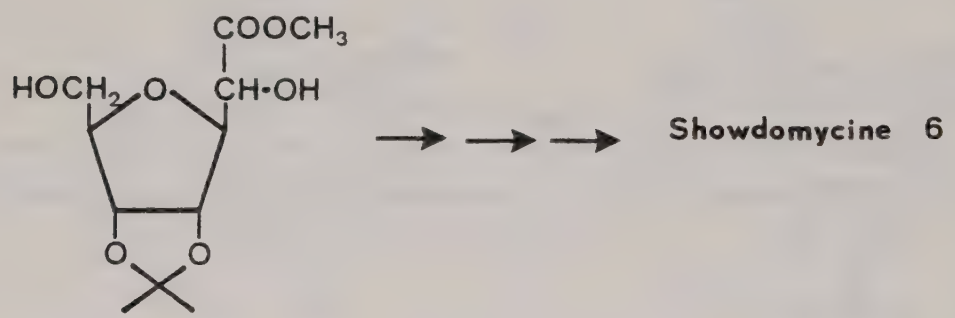
20 21 22 23

1) H_2O_2, OsO_4

2) acétone, diméthoxypropane, APTS

3) élimination de NO_2H

L'ester bicyclique **23** après ozonolyse et réduction, donne le diol **24** qui, après protection de l'alcool primaire et oxydation de l'alcool secondaire réagit par exemple sur le carbamoylméthylène-triphénylphosphorane conduisant ainsi directement à la D,L showdomycine.

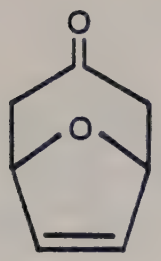


24

2) Synthèses à partir du furanne et tétrabromoacétone

L'intermédiaire **25** a permis d'effectuer des synthèses stéréocontrôlées de C-nucléosides comme la showdomycine, la pseudourine, la pseudoisocytidine (14).

Il est facilement obtenu par couplage de l'$\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ tétrabromoacétone sur le furanne catalysé par $Fe_2(CO)_9$, suivi d'une réduction par Zn/Cu (14). L'avantage de cet intermédiaire est qu'il permet d'effectuer une dihydroxylation cis parfaitement stéréosélective avec un rendement de 65 % (**26**).



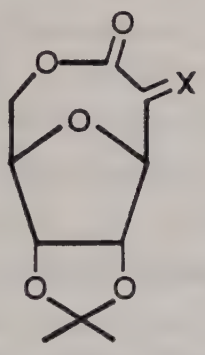
25

26

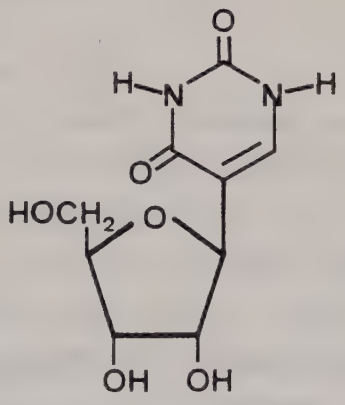
L'oxydation de **26** par une réaction de Baeyer Villiger (CF_3COO_2H) donne la lactone **27**. La condensation de cette dernière avec le réactif déjà mentionné ($[(CH_3)_2N]_2CHOC(CH_3)_3$) donne **28** qui peut servir de précurseur direct pour la synthèse de nombreux C-nucléosides.

Par exemple, quand **28** est chauffé au reflux de l'éthanol et en présence d'éthylate de sodium et d'urée, on obtient la pseudo-uridine **29** (D,L) (après hydrolyse acide du groupement isopropylidène).

27



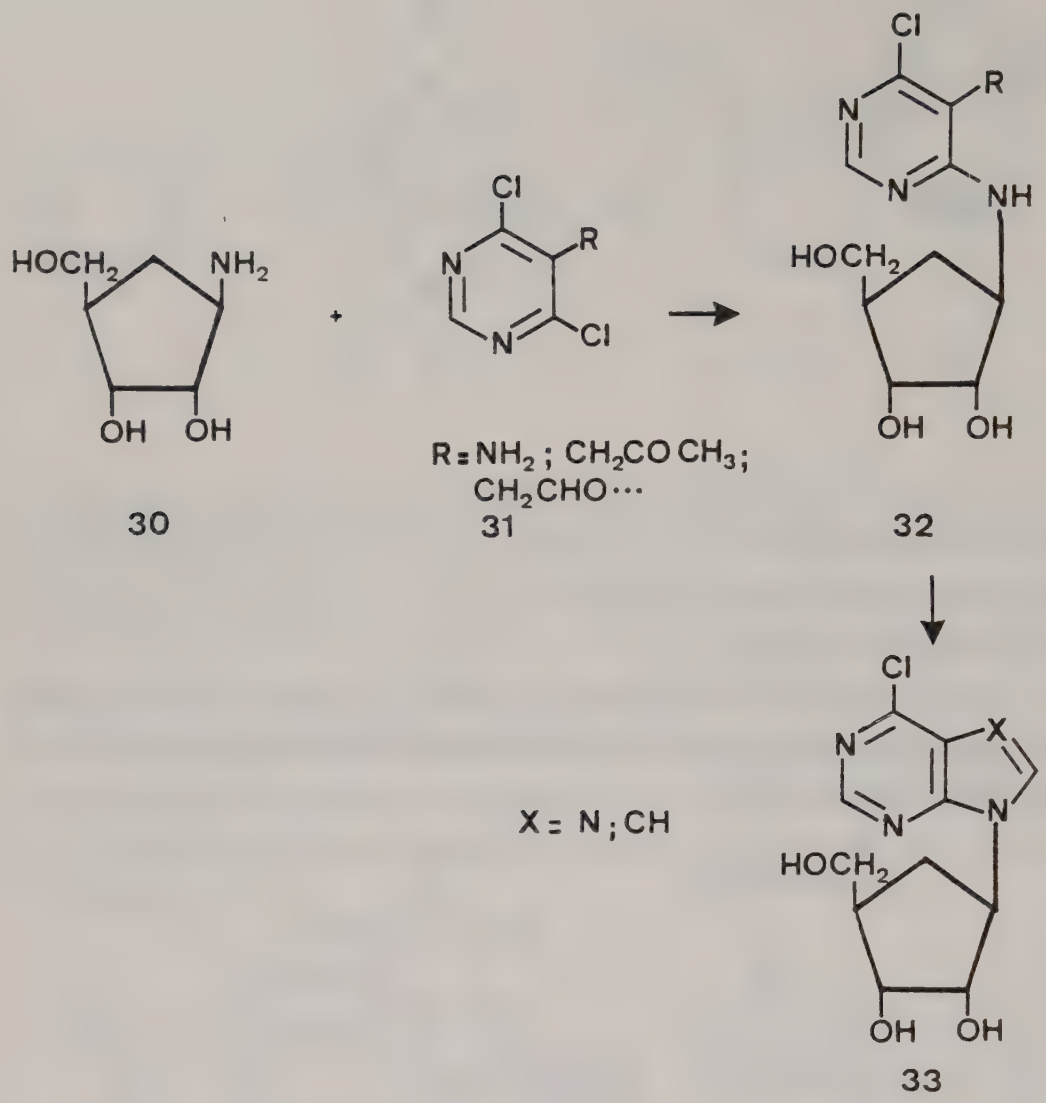
28



29

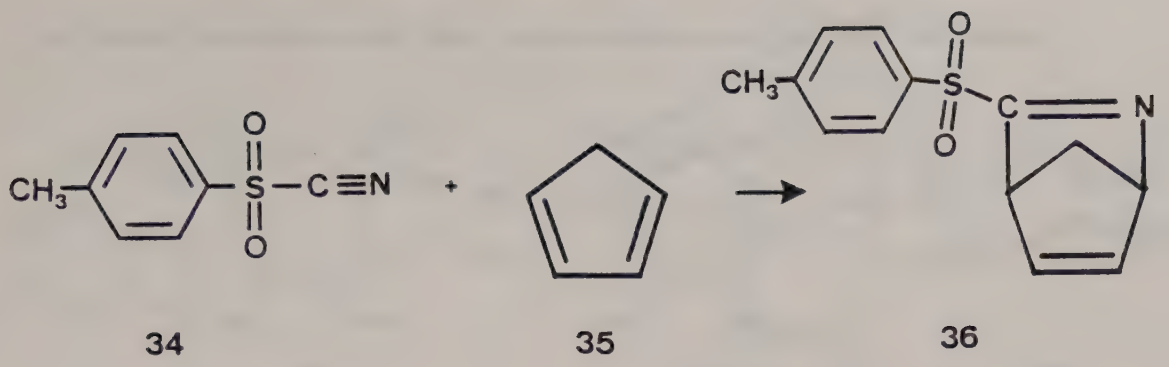
B) Méthodes de synthèse des nucléosides carbocycliques

La stratégie générale consiste à "condenser" un amino-cyclopentane diversement substitué comme **30** sur une dichloro-4,6 pyrimidine du type **31**.



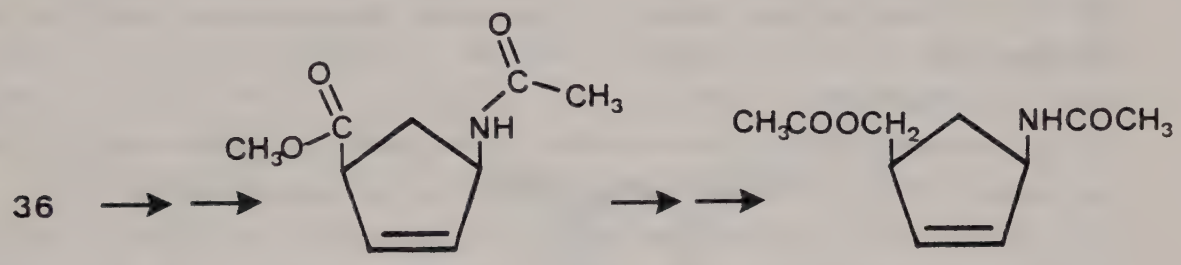
Le dérivé **32** est ensuité cyclisé pour donner l'analogue de nucléoside **33.** La difficulté réside dans la synthèse stéréosélective de l'amino-cyclopentane **30.** Pour ce faire, Daluge et Vince ont décrit en 1976 (15) la synthèse d'un intermédiaire permettant d'accéder à des amino-4 hydroxyméthyl-1 cyclopentane du type **30** où il est possible d'introduire sélectivement des fonctions hydroxyles ou amines en position 2 et 3 ayant une stéréoisomérie α ou β .

En effet, le cyanure de tosyle **34**, obtenu à partir du chlorure de cyanogène et du sel de sodium de l'acide paratoluène sulfinique, réagit selon une réaction de type Diels-Alder sur le cyclopentadiène **35** pour conduire au composé **36** qui, par hydrolyse acide, conduit au dérivé **37.**



34 35 36

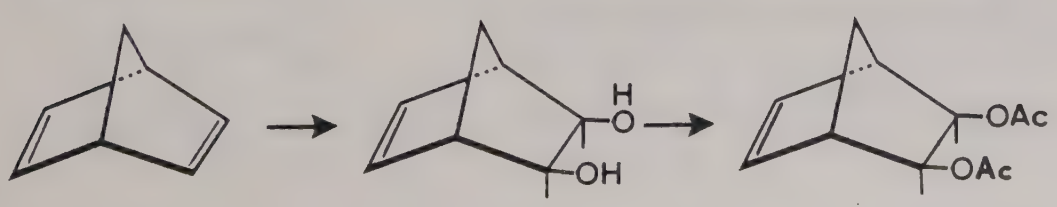
La réduction sélective de la fonction méthylester est ensuite effectuée par le borohydrure de calcium dans le THF. Après acétylation, on obtient le produit intermédiaire **38.**



37 38

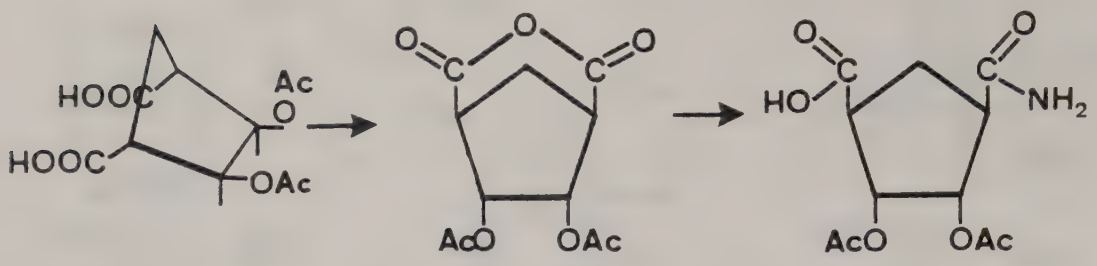
Celui-ci est l'intermédiaire que nous utiliserons pour synthétiser divers analogues carbocycliques de nucléosides. En effet, par dihydroxylation cis ou trans, il fournit les analogues carbocycliques de la ribosylamine, de la lyxosylamine, de la xylosylamine ou de l'arabinosylamine. Il permet également d'envisager la synthèse d'analogues carbocycliques de nucléosides aminés comme la puromycine. L'intermédiaire **38** a d'ailleurs déjà permis de synthétiser plusieurs nucléosides carbocycliques ((15-18).

Shealy et Clayton en 1969 avaient envisagé une stratégie différente de synthèse des précurseurs carbocycliques (19-20). Ces auteurs utilisent le norbornadiène **39** comme composé de départ. Ce dernier est oxydé à basse température par des agents hydroxylants cis ($KMnO_4$ ou OsO_4) avec un rendement assez faible (20-30 %) pour conduire à **41.**



39 40 41

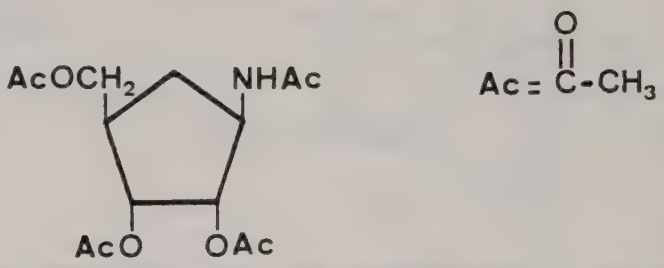
L'oxydation complète de la double liaison de **41** donne ensuite **42** puis **43** et



42 **43** **44**

l'ammoniac réagit sur ce dernier pour conduire au composé **44.**

Pour obtenir un cyclopentane de type **30,** il faut effectuer ensuite une réaction d'Hofmann à l'hypobromite, esterifier la fonction carboxyle, réduire la fonction méthylester et acétyler les fonctions alcools et amine, Quatre étapes supplémentaires sont donc nécessaires pour aboutir à **45** qui après désacétylation fournit un produit identique à **30.**

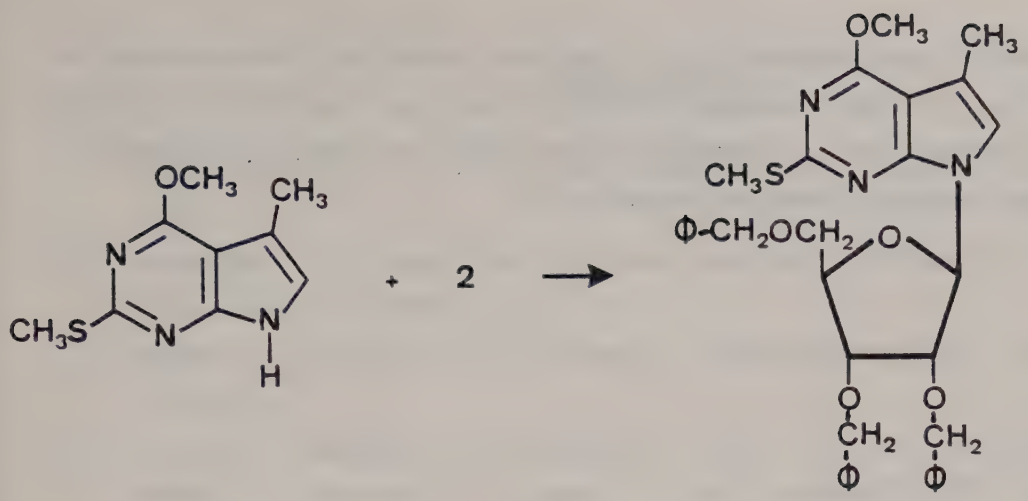


45

Cette synthèse est donc beaucoup plus laborieuse que la synthèse de Daluge et Vince. En outre, elle ne permet de synthétiser que des analogues du ribose (les deux fonctions alcools secondaires étant trans par rapport au groupement amine). Cette voie a permis néanmoins de synthétiser des nucléosides nouveaux (21-23).

C) Voies d'accès aux nucléosides dérivés des pyrrolo [2,3-d] pyrimidines

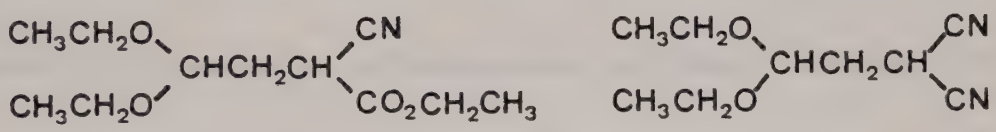
Les nucléosides dérivés des pyrrolo [2,3-d] pyrimidines décrits dans la littérature ont été synthétisés par condensation du noyau pyrrolo [2,3-d] pyrimidine sur un sucre bromé en position 1 et dont les fonctions alcools 2,3 et 5 avaient été préalablement protégées (2). C'est ainsi qu'a été réalisée, par exemple, la synthèse du nucléoside Q (24) (voir Tableau I de l'Introduction).



46 47

(le produit **47** étant l'intermédiaire clé dans la synthèse totale du nucléoside Q). Plusieurs auteurs ont utilisé cette stratégie (25), toutefois, la condensation du noyau pyrrolo [2,3-d]pyrimidine a également pu être effectuée sur un sucre tétraacétylé (26,27).

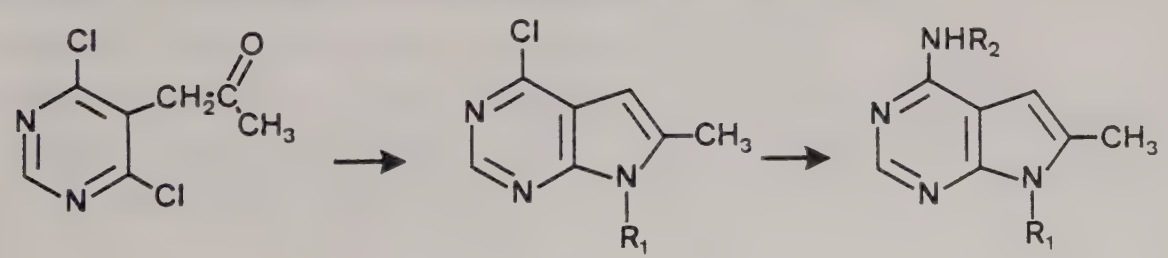
En ce qui concerne la synthèse du noyau proprement dit, elle a été réalisée par Davoll en 1960 (28) par condensation du mononitrile **48** ou du dinitrile **49** sur la guanidine, l'urée ou la thiourée permettant ainsi d'obtenir des pyrimidines facilement cyclisables en pyrrolo [2,3-d]pyrimidine par l'acide chlorhydrique dilué.



48 49

Bien que moins utilisée, l'autre possibilité d'accès au noyau déaza-7 purine, consiste à effectuer la synthèse à partir du noyau pyrrole (29,30).

La synthèse que nous avons utilisée a été décrite en 1969 au laboratoire (31). Elle permet à partir de la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine **50**, d'obtenir des pyrrolo [2,3-d] pyrimidines diversement substituées sur leurs positions 4 et 7 (52).



50 51 52

La synthèse de la pyrimidine **50** est effectuée à partir de la chloroacétone et du malonate d'éthyle. L'acétonyl malonate d'éthyle obtenu est transformé en dérivé dioxolanne qui se condense sur la formamidine pour former une dioxo-4,6 acétonyl-5 pyrimidine qui après chloration fournit la pyrimidine **50.**

BIBLIOGRAPHIE

1) De Las Heras, F.G., Tam, S.Y.-K., Klein, R.S. and Fox, J.J., J. Org. Chem. 41, 84 (1976).

2) Buchanan, J.G., Edgar, A.R., Power, M.J. and Williams, G.C., Carbohydrate Research 55, 225 (1977).

3) Buchanan, J.G., Edgar, A.R., Power, M.J. and Shanks, C.T., J. Chem. Soc. Perk. I, 225 (1979).

4) Fox, J.J., Watanabe, K.A., Klein, R.S., Chu, C.K., Tam, S.Y.-K., Reichman, U., Hirota, K., Wempen, I., Lopez, C. and Burchenal, J.H., Colloque INSERM Nucleosides, Nucleotides 81, 241 (1978).

5) Ohrui, H., Jones, G.H., Moffatt, J.G., Maddox, M.L., Christensen, A.T. and Byram, S.K., J. Am. Chem. Soc. 97, 4602 (1975).

6) De Bernardo, S. and Weigele, M., J. Org. Chem. 42, 109 (1977).

7) Lim, M.I., Klein, R.S. and Fox, J.J., Tetrahedron Lett. n° 21, 1013 (1980).

8) Bobek, M. and Farkas, J., Collect. Czech. Chem. Commun. 34, 247 (1969).

9) Montgomery, J.A. and Hewson, K., J. Het. Chem. 12, 111 (1975).

10) Poonian, M.S. and Nowoswiat, E.F., J. Org. Chem. 42, 1109 (1977).

11) Huynh-Dinh, T., Igolen, J., Bisagni, E., Marquet, J.P. and Civier, A., J. Chem. Soc. Perk. I, 761 (1977).

12) Just, G., Liak, T.J., Lim, M.I., Potvin, P. and Tsantrizos, Y.S., Canad. J. Chem. 58, 2024 (1980).

13) Just, G., Martel, A., Grozinger, K. and Ramjeesingh, M., Canad. J. Chem. 53, 131 (1975).

14) Noyori, R., Sato, T. and Hayakawa, Y., J. Am. Chem. Soc. 100, 2561 (1978).

15) Daluge, S. and Vince, R., Tetrahedron Lett. n° 35, 3005 (1976).

16) Vince, R. and Daluge, S., J. Med. Chem. 20, 612 (1977).

17) Daluge, S. and Vince, R., J. Org. Chem. 43, 2311 (1978).

18) Vince, R. and Daluge, S., J. Org. Chem. 45, 531 (1980).

19) Shealy, Y.F. and Clayton, J.D., J. Am. Chem. Soc. 91, 3075 (1969).

20) Shealy, Y.F. and Clayton, J.D., J. Am. Chem. Soc. 88, 3085 (1966).

21) Shealy, Y.F. and O'Dell, C.A., Tetrahedron Lett. n° 27, 2231 (1969).

22) Shealy, Y.F. and O'Dell, C.A., J. Het. Chem. 17, 353 (1980).

23) Shealy, Y. F., O'Dell, C.A. and Thorpe, M.C., J. Het. Chem. 18, 383 (1981).

24) Ohgi, T., Kondo, T. and Goto, T., J. Am. Chem. Soc. 101, 3629 (1979) ; Kondo, T., Ohgi, T., and Goto, T., Agric. Biol. Chem. 41, 1501 (1977).

25) Lüpke, U. und Seela, F., Chemische Berichte 112, 3431 (1979) ; Lüpke, U. und Seela, F., Chemische Berichte 112, 3526 (1979) ; Winkeler, H.D. und Seela, F., Chemische Berichte 113, 2069 (1980) ; Seela, F., Tran-Thi, Q.H. und Winkeler, H.D., Chemische Berichte 114, 1217 (1981).

26) Tolman, R.L., Robins, R.K. and Townsend, L.B., J. Am. Chem. Soc. 91, 2102 (1969).

27) Ektova, L.V., Tolkachev, V.N., Kornveitz, M.Z., Preobrazhenskaya, M.N., Chimie Bioorganique 4, 1250 (1978).

28) Davoll, J., J. Chem. Soc., 131 (1960).

29) Richter, R. and Ullrich, H., J. Org. Chem. 38, 2614 (1973).

30) Rae Etson, S., Mattson, R.J. and Sowell, J.W. Sr., J. Het. Chem. 16, 929 (1979).

31) Bisagni, E., Marquet, J.P. et André-Louisfert, J., Bull. Soc. Chim. de France, 4338 (1969).

DEUXIEME PARTIE :

RESULTATS DE NOS PROPRES TRAVAUX

Nous décrivons successivement dans les six chapitres qui suivent, nos essais de synthèse de plusieurs nouvelles familles de nucléosides.

Quand la synthèse a pu être menée à son terme, nous décrivons dans l'ordre la synthèse elle-même, puis les propriétés physicochimiques des molécules obtenus (preuves de structure). Les premiers résultats biologiques obtenus avec ces nouvelles molécules sont alors exposés à la fin de chaque chapitre.

Dans le cas où nous n'avons pas réussi à synthétiser les molécules désirées :

- C nucléosides dérivés des s-triazolo [4,3-d] triazines 1,2,4 (Chapitre II).
- nucléosides carbocycliques dérivés des pyrrolo-pyridines (Chapitre IV)

aucune étude biologique n'a été entreprise avec les intermédiaires obtenus.

Dans le cas des analogues carbocycliques de tubercidine (Chapitre III) des propriétés conformationnelles particulières ont été mises en évidence et une étude détaillée par résonance magnétique nucléaire leur a donc été consacrée.

CHAPITRE I

C-NUCLEOSIDES DERIVES DES S-TRIAZOLO [4,3-b] PYRIDAZINES

Aug. 1981

Synthesis of *s*-Triazolo[4,3-*b*]pyridazine *C*-Nucleosides (1)

Michel Legraverend, Emile Bisagni and Jean-Marc Lhoste

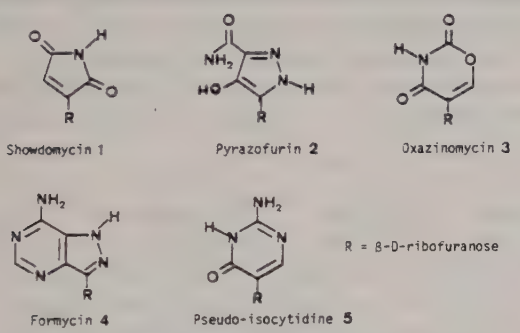
Laboratoire de Synthèse Organique, Institut Curie, Section de Biologie,
Bâtiment 110-112, 91405 Orsay, France

Received January 28, 1981

A one step synthesis of *s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine using 3-chloro-6-hydrazinopyridazine and an appropriate thioformimidate is described. Applying this procedure to 5-*O*-benzoyl-1-benzylthio-1-formimidate-D-ribofuranose, 5′ benzoyl-6-chloro-3β-D-ribofuranosyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine was obtained. Substitutions of chlorine by nucleophilic reagents afforded some derivatives of a new series of *C*-nucleosides. Structural determination including anomeric configuration assignment is discussed based mainly on ^{1}H nmr spectroscopy.

J. Heterocyclic Chem., **18**, 893 (1981).

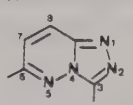
The isolation from various streptomyces (2-4) of several *C*-nucleoside antibiotics characterized by the presence of a carbon to carbon linkage between the sugar and heterocyclic moieties, has stimulated a great interest toward the synthesis of such compounds. Naturally occurring *C*-nucleosides such as showdomycin (**1**), pyrazofurin (**2**), oxazinomycin (**3**) and formycin (**4**), exhibit antitumor activity as well as very specific biochemical properties (5-7).



Pseudoisocytidine (**5**), a synthetic *C*-nucleoside, has been shown to be very effective in inhibiting the growth of P815 and L1210 leukemic cells *in vitro* and *in vivo* (8). Furthermore, these compounds seem to be resistant to catabolic reactions in cells, due to the resistance of the carbon-carbon glycosidic bond to nucleoside phosphorylases (8).

Numerous *C*-nucleoside analogs have been recently synthesized using different starting material (9-16). Ribofuranosylthioimidate has proved to be one useful starting compound leading to different *C*-ribosyl nucleosides including 8-amino-3(β-D-ribofuranosyl)-*s*-triazolo[4,3-*a*]pyrazine (16), 3-β-D-ribofuranosyl-1,2,4 triazolo-5-carboxamide (17) and 3-β-D-ribofuranosyl-*s*-triazolo-[4,3-*a*]pyridine (18).

The present paper reports a convenient synthesis of a new class of *C*-nucleosides, namely, 3-β-D-ribofuranosyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine derivatives.



Results and Discussion.

Although the *s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine system has already been studied (19), we first investigated conditions for its synthesis which would allow the introduction of a C-3 ribosyl moiety. The reaction of 3-chloro-6-hydrazinopyridazine (**6**) (20) with benzylthio acetimidate (**7**, R = CH_3) and benzylthiophenylacetimidate (**7**, R = CH_2 C_6H_5) in pyridine afforded 3-substituted-6-chloro-*s*-triazolo-[4,3-*b*]pyridazines (**8**) and (**9**), respectively. However, compound **6** reacted with methyl orthoacetate under reflux giving triazolo pyridazine (**8**) in higher yields (93%). No difficulty had been reported previously for the preparation of 3-aminopyridazine from 3-chloropyridazine although it is known that during aminolysis side reactions may occur, the most common being the solvolytic displacement of the halogen with the formation of methoxypyridazine (21). In the *s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine series, this side reaction seems to be the most important one. Thus, preliminary experiments were performed with compound **8** and methanolic or ethanolic ammonia at 100° in a sealed vessel affording 6-methoxylated and 6-ethoxylated derivatives (**10**) and (**11**) in 82 and 73.8% yield respectively. At room temperature in methanol, a mixture of 6-methoxy derivative (**10**) and 3-methyl-6-amino-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**12**) was obtained in poor yield. Aqueous ammonia at 100° under pressure transformed the 6-chloro compound (**8**) into a mixture of corresponding 6-amino derivative (**12**) (31%) and 3-methyl-6-hydroxy-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**13**) (6%), respectively. This latter compound has also been obtained from **8** with a molar equivalent of aqueous potassium hydroxide. In contrast with aqueous methylamine at 100° in a sealed vessel, 6-methylamino derivative (**14**) was obtained in high yield (93%) and no hydroxylated compound (**13**) was detected. In the same way, benzylamine and pyrrolidine reacted with compound **8** in refluxing methyl cellosolve giving the expected corresponding amino derivatives (**15**) and (**16**).

Thus, it can be pointed out that substitution of the 6-chlorine atom in *s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine system

0022-152X/81/050893-06$02.25

© HeteroCorporation

occurs normally with primary and secondary amines and that with alcoholic ammonia, solvolysis could frequently become the predominent reaction.

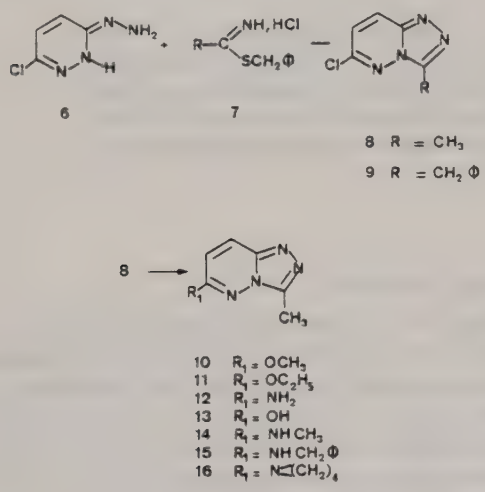


Figure 1

In the carbohydrate series, condensation of 5-*O*-benzoyl-1-benzylthioformimidate ribofuranose hydrochloride (**17**) (22,23,24) with 6-chloro-3-hydrazinopyridazine (**6**) gave a mixture of 6-chloro-3-α-D-ribofuranosyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]-pyridazine (**18**α) (3%) and 52% of the corresponding β-anomer (**18**β). This reaction was performed at room temperature to avoid substitution of 6-chlorine atom by the benzylmercaptan ion. Due to the small quantities of the α-anomer available, deprotection of the 5'-OH group as well as substitutions of the 6-chlorine atom were only studied with the β-anomer (**18**β), by action of several nucleophilic agents under various experimental conditions.

In methanolic ammonia, methoxylated derivative (**19**) was obtained exclusively and no amino derivative (**20**) could be detected. In another attempt performed at 5° under mild conditions, diluted methylamine in methanol to solubilize the starting material transformed **18**β yielding a mixture of four compounds. These are: a) 3-(5'-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranoysl)-6-methoxy-*s*-triazolo[4,3-*b*]-pyridazine (**21**) (5.2%); b) the corresponding 6-methyl-

Table I

Relaxation Times (in seconds) for 18α and 18β Anomers

Compound	H1'	H2'	H3'4'5'5"	H7	H8	Hoo'	Hmm'
18α	0.85	—	0.5	1.89	1.88	1.43	1.41
18β	2.30	1.03	0.5	2.05	2.05	1.60	1.48

Hoo' and Hmm' represent *ortho* and *meta* protons, respectively, of the benzoyl group.

Table II

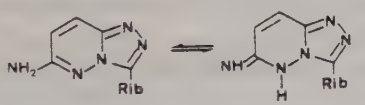
^{1}H Nmr Chemical Shifts (ppm) at 100 MHz in DMSO-d_6 (a)

Compound No.	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-5"	OH-2'	OH-3'	OH-5'	H-7	H-8	CH_3	NH	$\varnothing_{oo'}$	$\varnothing_{mm'}$
18α	5.79	4.50	4.23	4.38	-	4.60 (b)	5.03	5.23	-	7.48	8.44	-	-	8.03	7.60
	(4.4)	(4.8)	(8.2)				(4.5)	(7.1)			(9.7)				
18β	5.32	4.73	4.39	4.25	4.52	4.42 (b)	5.43	5.31	-	7.50	8.45	-	-	8.23	7.88
	(4.4)	(4.6)					(5.5)	(6.0)			(9.7)				
					(5.6)										
19	5.19	4.68	4.16	3.89	3.57	3.45	5.17	5.00	4.68	7.08	8.25	4.00	-	-	-
	(6.0)	(5.0)	(4.8)	(4.5)	(11.6)		(6)	(5.3)	(5.7)		(9.8)				
20 (c)	5.15	4.61		3.98 (d)	3.46 (d)		-	-	-	7.05	8.17	-	-	-	-
	(5.7)										(9.7)				
21	5.29	4.74	4.49	4.39	4.22 (d)		5.36	5.28	-	7.05	8.23	3.98	-	7.90	7.57
	(4.8)						(5.6)	(6.3)			(9.8)				
22	5.25	4.71	4.11			4.51 (d)	5.30	4.80	-	6.77	7.89	2.81	7.18	7.94	7.54
	(5)										(10)	(5)			
					(5.6)										
23	5.13	4.66	4.15	3.86	3.58	3.45	5.11	4.94	4.70	6.79	7.89	2.81	7.38	-	-
	(5.9)	(5.3)	(4.3)	(4.5)	(11.7)		(6)	(5.3)	(5.7)		(9.9)		(4.9)		

(a) Numbers in parentheses represent coupling constants, in hertz, between vicinal protons and are given in the order: $J_{1'2'}$, $J_{2'3'}$, $J_{3'4'}$, $J_{4'5'}$, $J_{5'5''}$, $J_{4'5''}$, $J_{1'OH2'}$, $J_{3'OH3'}$, $J_{5'OH5'}$, J_{78}, J_{NHCH_3}. (b) Assignments not certain for these three protons. (c) In DMSO-d_6, broad signals were obtained, therefore nmr spectrum was carried out with **20** in DMSO-d_6 in the presence of 10μl of deuterium oxide and 10 μl of deuteriotrifluoroacetic acid. (d) Non resolved signals.

amino-5′-*O*-benzoyl derivative (**22**) (10.6%); c) the 5′-deprotected 6-methoxynucleoside (**19**) identical with the one already obtained (15.6%); and d) 6-methylamino-3-β-D-ribofuranosyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**23**) (10.7%).

Again these findings emphasize the solvolytic effect of the methanol and the easy substitution of the 6-chlorine atom. They explain why we failed in obtaining selective 5′-*O*-debenzoylation in order to prepare 6-chloro-*C*-nucleoside (**25**). With the goal of avoiding alcoholysis of the chlorine atom, compound **18**β was treated with aqueous ammonia under various conditions (100° for 18 hours, 60° for 4 hours or 18 hours at room temperature). In every case, a mixture of at least six compounds was obtained which separated by analytical thin layer chromatography on silical gel (ethyl acetate-methanol-water-formic acid: 100-25-20-1); (**20**) was isolated from this mixture in low yield (5.6%). Since no difficulty was encountered to synthesize the methylamino derivative (**23**), the problems to obtain the amino derivative (**20**) were rather surprising. On the other hand, the behavior of **20**, in the nmr was unusual. Broad signals were observed for all protons in DMSO-d_6 whereas good resolutions resulted from addition of a small amount of trifluoroacetic acid and water. This may be interpreted by the presence of an equilibrium between two prototropic forms:



This hypothesis, which is consistent with the possibility of hydrogen bonding between the base and cyclic oxygen of the sugar explains the unresolved peaks in nmr when performed in DMSO. Only one form is present under acidic conditions. The presence of two forms for **20** may also explain the additional fragmentation observed in mass spectrometry.

Surprisingly with sodium hydroxide in aqueous dioxane, no expected hydroxylated nucleoside (**24**) could be characterized. We have not found satisfactory explanation to this failure. However, aqueous methylamine at 100° in a sealed vessel afforded in satisfactory yield (55%), 6-methylamino-3-*C*-nucleoside (**23**) already obtained in low yield under milder conditions in methanol.

Structural assignments of nucleosides were based on elemental analysis, uv, ^{1}H nmr and mass spectra. In agreement with previous work using ribosylthioformimidate derivatives (16-18) condensation of 3-chloro-6-hydrazinopyridazine (**6**) with thioformimidate (**17**) afforded predominantly the β-anomer which was separated from the α-anomer by chromatography on a silice gel column. A β/α ratio of 95/5 was found.

The availability of the α and β anomers of the 5′ OH protected compounds (**18**) allowed an easy determination

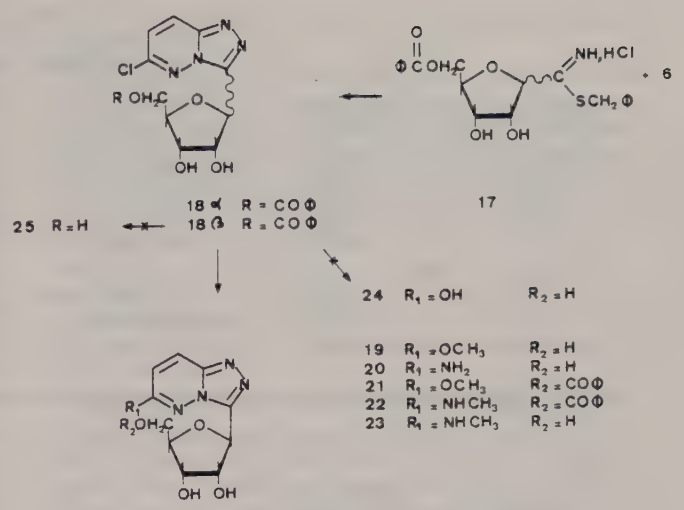


Figure 2

of their anomeric configuration by ^{1}H nmr spectroscopy. Thus, it has been shown previously (25) that the relaxation time of the anomeric H 1′ proton of the β anomer is about two and a half times longer than that of the α anomer which in turn is of the same order of magnitude than the other protons of the ribose ring. Therefore **18**α and **18**β have been unambiguously identified by the measurement of the relaxation times of ribose protons (Table I). Furthermore chemical shift assignments of the different protons is in full agreement with the proposed structures (Table II).

The structure of the nucleosides is also supported by their mass spectra which show characteristic peaks at B + 2H, B + 30 and B + 44 (Table III) as observed previously (18,23). As expected B + H and B + 2H fragments are absent or very low for all C nucleosides studied. This is in itself indicative of the carbon-carbon glycosidic bond structure. On the other hand, B + 30 and B + 44 are always observed as major fragmentations. Nevertheless B + 44 is the major peak (100% relative intensity) and this represents an exception to the proposed emperical rule which stipulates the B + 30 fragment as the major peak (100% relative intensity) in *C*-nucleosides (26,27). As a characteristic feature of the C-C glycosidic bond structure, the absence of fragmentation giving a peak at m/e 133 (ribose) should be pointed out.

Ultraviolet absorption spectra of all *C*-nucleosides presently described are similar to those of the corresponding heterocycle compound.

EXPERIMENTAL

Melting points were determined with a Kofler Apparatus and were uncorrected. Ultraviolet spectra were recorded with Cary 118C. Nmr spectra were obtained using a Varian XL-100 with tetramethylsilane as the internal reference. Mass spectra were obtained by M.C. Bosso, CERMAV, Grenoble, with a MS30 AEI Cratos apparatus equipped with a computer

Table III

Mass Spectrometry Data at 70 ev, 150°C (a)

Compound	B + 2H	B + 30	B + 44	M+	Other Peaks (b)
18α	155 (14)	183 (85)	197 (32)	390 (1.6)	105 (100)
18β	155 (18)	183 (85)	197 (100)	390 (4.3)	105 (66)
19	151 (13)	179 (37)	193 (100)	—	—
20	136 (32)	164 (48.2)	178 (100)	—	122 (29); 128 (23); 149 (36); 202 (11)
21	151 (14)	179 (100)	193 (47)	386 (5)	105 (60)
22	150 (15)	178 (35)	192 (100)	—	105
23	150 (17)	178 (54)	192 (100)	—	—

(a) Numbers in parentheses represent percentages of the base peak. (b) C_6H_5-C≡Ô ion: m/e = 105.

Table IV

Ultraviolet Absorption Spectral Data

Compound	λ max (ε) in ethanol	
8	216 (28200)	311 (2400)
9	220 (30000)	310 (2100)
10	212 (21200)	272 (3700)
12	224 (26900)	284 (5200)
13	216 (26400)	311 (2000)
14	229 (26800)	285 (4800)
18α	220 (38200)	310 (2500)
18β	220 (36600)	310 (1800)
19	216 (20000)	272 (3600)
20	224 (19900)	275 (4800)
21	214 (24500)	272 (2000)
22	230 (28000)	285 (3200)
23	230 (25000)	285 (3900)

Varian 100 MS. Chromatography were performed with Kieselgel 60, 230 mesh, Merck. Microanalyses were performed by the "Service Central de Microanalyse" CNRS-ICSN, 91190-Gif/Yvette, France.

6-Chloro-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**8**).

Method A.

Ten g (69 mmoles) of 3-chloro-6-hydrazinopyridazine (20) (**6**) and 13.9 g (69 mmoles) of benzylthiomethylacetamimidate (**7**) (R = CH_3) in 100 ml of pyridine were stirred overnight at room temperature and heated under reflux for an additional 2 hours. The residue, after evaporation under reduced pressure, was extracted twice with hot cyclohexane. Pure compound crystallized after cooling to yield 6.5 g (56%) of **8** mp 107-108°.

Method B.

3-Chloro-6-hydrazinopyridazine (20) (**6**) (10 g, 69 mmoles) in distilled methyl orthoacetate (60 ml) was heated under reflux overnight. After evaporation to dryness, the residue was recrystallized in cyclohexane to afford 10.8 g (93%) of **8** mp 107-108°; ms: m/e 168.0 (100% M⁺) and 170.0 (31% M⁺).

Anal. Calcd. for $C_6H_5ClN_4$ (168.5): C, 42.72; H, 2.96; N, 33.23. Found: C, 42.91; H, 3.08; N, 33.02.

3-Benzyl-6-chloro-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**9**).

A solution of 5.8 g (40.1 mmoles) of 3-chloro-6-hydrazinopyridazine (**6**) and 11.1 g (40 mmoles) of benzylthiophenylacetimidate (**7b**) (R, $CH_2ø$) (28) in 100 ml of pyridine was stirred overnight at room temperature and refluxed for an additional 2 hours. The residue of evaporation was purified on a silica gel column (ethyl acetate-ethanol 9-1 v/v) yielding 1.4 g (14%) of **9** mp 128-130°; ms: m/e 244 (8% = M+) and 209 (100% = M − 35).

Anal. Calcd. for $C_{12}H_9ClN_4$ (244.5): C, 58.89; H, 3.68; N, 22.9; Cl, 14.51. Found: C, 59.13; H, 3.82; N, 22.47; Cl, 14.06.

3-Methyl-6-methoxy-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**10**).

6-Chloro-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**8**) (2 g, 11.8 mmoles) was heated in a steel vessel at 100° for 4 hours in 80 ml of methanol previously saturated with ammonia. After evaporation of the solvent, recrystallization from hot cyclohexane yielded 1.6 g (82%) of **10**, mp 170°.

Anal. Calcd. for $C_7H_8N_4O$ (164): C, 51.21; H, 4.91; N, 34.1. Found: C, 51.37; H, 4.91; N, 33.97.

6-Ethoxy-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**11**).

As described above for **10**, **11** (1.31 g, 73.8%) was obtained from **8** (1.68 g, 10 mmoles) in 80 ml of ethanol-ammonia for 4 hours at 100° in a steel vessel, mp 135°.

Anal. Calcd. for $C_8H_{10}N_4O$ (178): C, 53.92; H, 5.66; N, 31.45. Found: C, 53.85; H, 6.01; N, 31.25.

6-Amino-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**12**) and 3-Methyl-6-hydroxy-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**13**).

6-Chloro-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**8**) (1 g, 5.9 mmoles) was heated in 28% aqueous ammonia (100 ml) in a steel vessel for 4 hours at 120°. After addition of sodium hydroxide (236 mg, 5.9 mmoles) and evaporation, recrystallization from hot water afforded 273 mg (31.3%) of **12**, mp > 250°.

Anal. Calcd. for $C_5H_7N_5$ (149): C, 48.32; H, 4.69; N, 46.97. Found: C, 48.37; H, 4.65; N, 46.67.

Recrystallization of the residue from hot dioxanne afforded 54 mg (6.1%) of **13**, mp > 250°; ms: m/e 150.1 (100% M⁺).

Anal. Calcd. for $C_5H_6N_4O$ (150): C, 48.00; H, 4.02; N, 37.32. Found: C, 47.97; H, 3.98; N, 37.19.

6-Methylamino-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**14**).

6-Chloro-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**8**), 1 g (5.9 mmoles) was heated at 100° for 4 hours in a steel vessel with 100 ml of 33% aqueous methylamine.

After evaporation to dryness and solubilization in water, sodium hydroxide was added to neutralize the chlorhydrate. Recrystallization from hot water yielded 900 mg (93%) of pure **14**, mp 246-247°; ms: m/e 163.1 (100 M⁺).

Anal. Calcd. for $C_7H_9N_5$ (163): C, 51.53; H, 5.52; N, 42.94. Found: C, 51.27; H, 5.46; N, 42.84.

6-(Benzylamino)-3-methyl-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**15**).

Compound **8** (1.68 g, 10 mmoles) was heated under reflux for 1 hour with benzylamine (3.21 g, 30 mmoles) in 20 ml of methylcellosolve. The solvent was evaporated under diminished pressure and the residue recrystallized from ethanol yielding 1.5 g (62.7%) of **15**, mp 226-227°.

Anal. Calcd. for $C_{13}H_{13}N_5$ (239.27): C, 65.25; H, 5.48; N, 29.27. Found: C, 65.53; H, 5.78; N, 29.60.

3-Methyl-6(1 pyrrolidin)-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**16**).

As described above for **15** (1.6 g, 44.2%) of **16** was obtained from **8** (3 g, 17.8 mmoles), pyrrolidine (3.1 g, 43 mmoles) and 15 ml of methylcellosolve under reflux for 1 hour, mp 178° (ethanol).

Anal. Calcd. for $C_{10}H_{13}N_5$ (203): C, 59.0; H, 6.45; N, 34.46. Found: C, 58.82; H, 6.46; N, 34.31.

5-*O*-Benzoyl-1-benzylthioformimidate-D-ribofuranosyl, Chlorhydrate (**17**).

This compound was synthesized from 5-*O*-benzoyl-D-ribofuranosyl-1-cyanide (22,24) as described by Huynh-Dinh, *et al* (23) except that ether oxide was replaced by anhydrous dioxane.

3-(5'-*O*-Benzoyl-α and -β-D-ribofuranosyl)-6-chloro-*s*-triazolo[4,3-*b*]-pyridazine (**18**α) and (**18**β).

A solution of 8.1 g (19.1 mmoles) of freshly prepared thioformimidate **17** and 3 g (20.7 mmoles) of **6** in 70 ml of pyridine was stirred under anhydrous conditions for 24 hours at room temperature. The solution was then evaporated to dryness, and the residue was dissolved in aqueous methanol and neutralized with sodium hydroxide (1*N*). Silical gel column chromatography was then carried out in dichloromethane-ethanol (96-4) (50 × 4 cm) which allowed co-purification of the α and β anomers **18** (3.8 g, 51.3%). Compound **18**β recrystallized in ethanol and chromatography (50 × 2 cm) (ethyl acetate-ethanol: 8-2) (Rf **18**α = 0.51; Rf **18**β = 0.63) of the mother liquor afforded a total 3.61 g of **18**β (overall yield of 48.7%) and 0.19 g (overall yield of 2.6%) of **18**α. Compound **18**α had $[\alpha]_D^{20} = -53°$ (C = 0.45 ethanol) and **18**β had $[\alpha]_D^{20} = -98°$ (C = 1.1 ethanol). Compound **18**β had mp 152°.

Anal. Calcd. for $C_{17}H_{15}ClN_4O_5$ (390.5): C, 52.24; H, 3.84; N, 14.34; Cl, 9.09. Found: C, 51.90; H, 3.79; N, 14.05; Cl, 9.01.

Compound **18**α had mp 211°.

Anal. Calcd. for $C_{17}H_{15}ClN_4O_5$ (390.5): C, 52.25; H, 3.84; N, 14.34; Cl, 9.09. Found: C, 51.85; H, 3.97; N, 13.94; Cl, 9.24.

6-Methoxy 3-(β-D-ribofuranosyl)-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**19**).

A solution of 1 g (2.5 mmoles) of 3-(5'-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-6-chloro-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**18**) in methanolic ammonia (100 ml) was heated in a sealed tube overnight at 100°. The solvent was evaporated and the residue chromatographed on Sephadex G10 (water) (100 × 2 cm). Crystallization from ethanol yielded 0.4 g (56.7%) of **19**, mp 96°, Rf 0.19 (ethyl acetate-ethanol, 8/2); $[\alpha]_D^{20} = -45°$ (C = 0.35, ethanol).

Anal. Calcd. for $C_{11}H_{14}N_4O_5H_2O$: C, 44.00; H, 5.37; N, 18.66; O, 31.97. Found: C, 44.05; H, 5.17; N, 19.02; O, 31.76.

6-Amino-3-(β-D-ribofuranosyl)-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**20**).

A solution of 390,5 mg (1 mmole) of 3-(5'-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-6-chloro-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**18**β) in 34% aqueous ammonia (100 ml) was stirred overnight at room temperature. Thin layer chromatography of the resulting solution showed six different spots (silicagel, ethyl acetate-methanol-water-formic acid: 100-25-20-1). Only the product giving a Rf of 0.26 similar to the 6-methylamino derivative **23** was purified. Purification consisted of silica gel column chromatography with the solvent system mentionned above followed by chromatography with Sephadex G10 in water and recrystallization in ethanol which gave 15 mg (5.6%) of **20**, mp > 250°.

Anal. Calcd. for $C_{10}H_{13}N_5O_4$: C, 44.94; H, 4.90. Found: C, 44.73; H, 4.77.

3(5'-*O*-Benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-6-methoxy-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**21**) and 6-methylamino-3-(5'-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-*s*-triazolo-[4,3-*b*]pyridazine (**22**).

A solution of 390.5 mg (1 mmole) of **18**β in 30 ml of methanol and 3 ml of a 33% aqueous solution of methylamine was stirred (+5°) for 3 hours. After evaporation to dryness, the residue was subjected to a silica gel column (50 × 2 cm) (ethylacetate/methanol, 8:2) which allowed the separation of 4 compounds in the order **21** (20 mg, 5.2%); **22** (30 mg, 10.6%); **19** (60 mg, 15.6%) and **23** (30 mg, 10.7%) (**19** and **23** have been obtained in better yield in another experiment).

Compound **21** had mp 146-147°.

Anal. Calcd. for $C_{18}H_{18}N_4O_6 \cdot \frac{1}{2}H_2O$: C, 54.68; H, 4.81; N, 14.17. Found: C, 54.62; H, 4.69; N, 14.43.

Compound **22** had mp 72°.

Anal. Calcd. for $C_{18}H_{19}N_5O_5$: C, 56.10; H, 4.97; N, 18.17. Found: C, 56.26; H, 4.81; N, 18.07.

6-Methylamino-3-(β-D-ribofuranosyl)-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**23**).

A solution of 1.12 g (2.86 mmoles) of 3-(5'-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-6-chloro-*s*-triazolo[4,3-*b*]pyridazine (**8**) in 33% aqueous methylamine (100 ml) was heated in a sealed tube overnight at 100°. After evaporation to dryness, the residue was subjected to a Sephadex G10 column (water) (100 × 2 cm). Recrystallization from ethanol yielded 444 mg (55%) of **23**, mp 198°; $[\alpha]_D^{20} = -24°$ (C = 0.55, ethanol).

Anal. Calcd. for $C_{11}H_{15}N_5O_4,H_2O$ (299): C, 44.14; H, 5.73; N, 23.40. Found: C, 44.18; H, 5.80; N, 23.46.

REFERENCES AND NOTES

(1) This investigation was supported, in part, by funds from the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale". It was presented in part at the VII Symposium on Medicinal Chemistry, Malaga, Spain (1980).

(2a) H. Umezawa, T. Sawa, Y. Fukagawa, I. Homma, M. Ishizuka and T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, **20**, 308 (1967); (2b) H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatou, H. Kato, N. Shimaoka and Y. Tanaka, *J. Antibiot. Ser. A*, **17**, 148 (1964).

(3) R. J. Shuadolnik, "Nucleoside Antibiotics", Wiley Interscience, New York, N.Y., 1970.

(4) T. Haneishi, T. Okazaki, T. Hata, C. Tamura, M. Nomura, A. Naito, I. Seki and M. Arai, *J. Antibiot.*, **24**, 797 (1971).

(5) M. S. Kang, J. P. Spencer and A. D. Elbein, *J. Biol. Chem.*, **254**, 10037 (1979).

(6) E. Cadman, F. Eiferman, R. Heimer and L. Davis, *Cancer Res.*, **38**, 4610 (1978); *Cancer Treatment Rep.* **63**, 1857 (1979).

(7) H. T. Abelson and S. Penman, *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 292 (1973); J. Giziewicz, E. De Clercq, M. Luczak and D. Shugar, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1813 (1975).

(8) J. H. Burchenal, K. Ciovacco, K. Kalaher, T. O'Toole, R. Kiefner, M. D. Dowling, C. K. Chu, K. A. Watanabe, I. Wempen and J. J. Fox, *Cancer Res.*, **36**, 1520 (1976); T. C. Chou, J. H. Burchenal, J. J. Fox, K. A. Watanabe, C. K. Chu and F. S. Philips, *Cancer Res.*, **39**, 720 (1979).

(9) J. B. Buchanan, M. E. Chacon-Fuertes and R. H. Wightman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 244 (1979).

(10) M. I. Lims, R. S. Klein and J. J. Fox, *Tetrahedron Letters*, 1013 (1980).

(11) S. Y. K. Tam, R. S. Klein, I. Wempen and J. J. Fox, *J. Org. Chem.*, **44**, 4547 (1979).

(12) S. Y. K. Tam, R. S. Klein, F. G. de las Heras and J. J. fox, *ibid.*, **44**, 4854 (1979).

(13) T. Sato, M. Watanabe and R. Noyori, *Tetrahedron Letters*, 2897 (1979).

(14) M. S. Pooman and E. F. Nowoswiat, *J. Org. Chem.*, **45**, 203 (1980).

(15) G. Doukhan, T. Huynh-Dinh, E. Bisagni, J. C. Chermann et J. Igolen, *Eur. J. Med. Chem.*, **14**, 375 (1979).

(16) T. Huynh-Dinh, R. S. Sarfati, C. Gouyette, J. Igolen, E. Bisagni, J. M. Lhoste and A. Civier, *J. Org. Chem.*, **44**, 1028 (1979).

(17) T. Huynh-Dinh, J. Igolen, E. Bisagni, J. P. Marquet and A. Civier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 761 (1977).
(18) T. Huynh-Dinh, J. Igolen, J. P. Marquet, E. Bisagni and J. M. Lhoste, *J. Org. Chem.*, **41**, 3124 (1976).
(19) A. Pollak, B. Stanovnik and M. Tišler, *ibid.*, **35**, 2478 (1970).
(20) R. Schönbeck and E. K. Kloimstein, *Monats. Chem.*, **99**, 15 (1968).
(21) M. Tišler and B. Stanovnik, *Adv. Heterocyclic Chem.*, **9**, 271 (1968).
(22) M. Bobek, and J. Farkaš, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 247 (1969).
(23) T. Huynh-Dinh, A. Kolb, C. Gouyette and J. Igolen, *J. Heterocyclic Chem.*, **12**, 111 (1975).
(24) J. A. Montgomery and K. Hewson, *ibid.*, **7**, 443 (1970).
(25) S. Tran-Dinh, J. M. Neumann, J. M. Thiéry, T. Huynh-Dinh, J. Igolen and W. Guschlbauer, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3267 (1977).
(26) P. F. Crain, J. A. McCloskey, A. F. Lewis, K. H. Schram and L. B. Townsend, *J. Heterocyclic Chem.*, **10**, 843 (1973).
(27) L. B. Townsend and R. K. Robins, *ibid.*, **6**, 459 (1969).
(28) A. H. Cook, A. C. Davis, I. Heilbron and G. H. Thomas, *J. Chem. Soc.* 1071 (1949).
(29) Acknowledgment: The authors gratefully acknowledge Dr. T. Huynh-Dinh and D. J. Igolen for their advice and help in the preparation of 5-*O*-benzoyl-1-benzylthioformimidate ribofuranose hydrochloride (**17**).

Activité biologique

- Les produits **19**, **20** et **23** ne présentent aucune activité cytotoxique in vitro sur des cellules de la leucémie de Friend en culture (a).
- Ils ne présentent pas non plus d'activité sur la transformation de fibroblastes d'embryon de poulet par le virus du sarcome de Rous (b).

(a) Expériences réalisées par Martine Charon sous la responsabilité de Françoise Wendling et Pierre Tambourin (Unité 22 de l'INSERM, Institut Curie, Orsay)

(b) Expériences effectuées par Malka Robert-Géro (I.C.S.N., CNRS, Gif-sur-Yvette) que je remercie pour ces essais.

CHAPITRE II

ESSAI D'OBTENTION DE C-NUCLEOSIDES DERIVES DES S-TRIAZOLO [4,3-d] TRIAZINES 1,2,4

Tetrahedron Vol. 37, No. 24, pp. 4353 to 4356, 1981
Printed in Great Britain.

0040–4020/81/244353–04$02.00/0
© 1981 Pergamon Press Ltd.

SYNTHESE DE S-TRIAZOLO[4,3-d] ET [1,5-d] TRIAZINES-1,2,4

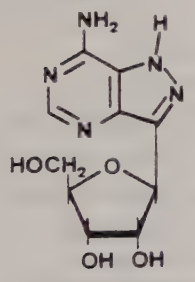
M. LEGRAVEREND, J.M. LHOSTE et E. BISAGNI

Institut Curie, Section de Biologie, Bâtiments 110 - 112
15, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay Cédex, France

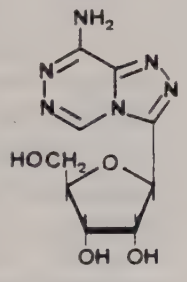
(*Received in France 5 October* 1981)

Abstract - 2-substituted s-triazolo[1,5-d] and 3-substituted s-triazolo [4,3-d]-1,2-4-triazine 8-ones were obtained starting from 5-(3)-alkyl-3(5)-carboxyhydrazino-1,2,4 triazoles and ethyl orthoformate. However, the same reaction was not found to be an efficient one in the case of 5(3)-β-D-ribofuranosyl-3(5)-carboxyhydrazino-1,2,4 triazole.

Parmi les nombreux nucléosides naturels, certains comportent une liaison C-C entre la base et le reste glycosylé. Ils correspondent à la classe des C-nucléosides.



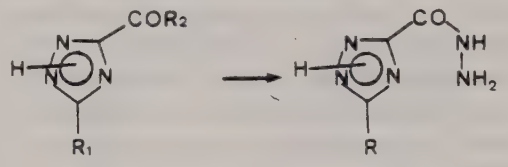
1



2

Parmi ceux-ci la formycine 1 présente des propriétés antitumorales[1]. Les analogues de cet antibiotique dérivés des s-triazolo[4,3-d] triazines-1,2,4 (formule générale 2) n'étant pas décrits et différents dérivés hétérocycliques du même type semblant présenter des propriétés inhibitrices de systèmes enzymatiques importants [2a,b], nous avons cherché à élaborer une méthode permettant d'y accéder. Bien que nous n'ayons pas encore obtenu les C-nucléosides correspondants, nous décrivons ici une voie d'accès à deux nouveaux systèmes hétérocycliques, les s-triazolo[4,3-d] et s-triazolo [1,5-d]triazines-1,2,4.

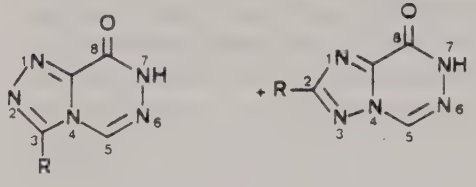
Les triazoles-1,2 4 (3,4 5) décrits antérieurement[3] réagissent avec l'hydrate d'hydrazine en donnant les hydrazides correspondants 6 (a-c) en très bons rendements.



3 $R_1 = CH_3$; $R_2 = OCH_3$ 6 (a,b,c)

4 $R_1 = CH_2C_6H_5$; $R_2 = NH_2$

5 R_1 = 5'-O Benzoyl-β-D-ribose
$R_2 = NH_2$



8 (a,b) 7 (a,b)

a: R = CH_3 ; b: R = $CH_2C_6H_5$;
c: R = β-D-ribose

A partir de ces derniers et suivant une hétérocyclisation déjà utilisée pour former des imidazo[1,2-d]triazines-1,2,4 (inhibiteurs de l'AMP-cyclique phosphodiestérase) et des pyrazolo[1,5-d]triazines-1,2,4[2] à partir d'hydrazides et d'orthoesters, nous pensions pouvoir obtenir les composés 7 et/ou 8 correspondants.

En fait, le méthyl-3(5)carboxyhydrazino-5(3) triazole-1,2,4 (6a) réagit bien avec l'orthoformiate d'étyle à reflux, mais, la réaction est très lente. La méthyl-3 dihydro-7,8 oxo-8 s-triazolo[4,3-d]-triazine-1,2,4 (8a) constitue le produit majoritaire de la réaction, isolé et purifié par chromatographie. Toutefois, nous n'avons pas réussi à caractériser son isomère 7a qui doit être présent à l'état de traces, parmi les nombreux produits détectés par chromatographie sur couche mince de silice. Au contraire, dans le cas du benzyl-3 (5)carboxyhydrazino-5(3)triazole-1,2,4 (6b), la cyclisation par l'orthoformiate d'éthyle fournit directement le composé 7b pur et la chromatographie des eaux mères de cristallisation permet ensuite d'isoler l'isomère 8b, à côté d'une nouvelle quantité de 7b. Le rendement global de la réaction étant de 73 %, on constate que la cyclisation sur l'azote 1 du triazole-1,2,4 de départ, est nettement favorisée puisque, au total, le rapport 7b/8b est de 9/1. Quant au dérivé ribosylé 6c, il a conduit à un mélange réactionnel complexe, à partir duquel nous n'avons réussi à isoler aucun composé défini, y compris en effectuant la réaction dans un solvant. La lenteur de la réaction (liée à l'insolubilité du produit de départ dans le milieu réactionnel, comme dans le cas du dérivé méthylé 6a) et la prolongation du temps de chauffage qui en découle, entraînent probablement la décomposition d'une part importante des produits ribosylés, ce qui explique sans doute nos échecs répétés. Ce résultat négatif nous a conduit à ne pas poursuivre dans cette direction. La structure des produits obtenus a cependant été établie avec certitude, notamment au moyen de la rmn ^1H et du ^{13}C qui apporte des critères d'identification sans lesquels il serait malaisé de choisir entre les deux isomères.

Ainsi, les spectres UV de 7b (pas de bande caractéristique) et de 8b (λmax = 233 ; ε = 12800) sont bien différents mais, à priori, ils ne permettent pas d'identifier les deux séries. On peut remarquer, toutefois, que le dérivé méthylé 8a présente un spectre caractéristique (λmax = 232 nm ; ε = 13300) comparable au spectre de 8b. Il en va de même pour les spectres de rmn ^1H (Tableau II) qui présentent une différence significative : δH-5 = 9,08 ppm pour 7b et δH-5 = 9,36 ppm pour 8b. Là aussi, cette différence distingue les isomères sans les identifier de façon absolue. Cependant, la comparaison des temps de relaxation T_1 de H5 dans 7b et 8b (Tableau I) est très significative. En effet, la contribution principale à la relaxation spin réseau, du proton H5 est l'intéraction magnétique dipolaire avec les autres protons de la molécule et dépend de la distance les séparant en fonction de r^{-6}.

Tableau I : Temps de relaxation spin réseau T_1 (exprimés en secondes) des protons indiqués*

protons \ produit	7b	8b
H5	14,6±1,6	10,1±0,9
CH_2	0,77±0,02	0,93±0,09
CH(Ø)**	5,50±0,13	3,91±0,08

* Ces mesures ont été effectuées dans le DMSOd6 dégazé sous argon par la méthode d'inversion récupération

** Temps apparents pour l'ensemble des protons phényles.

Les protons du groupement benzyle facilitent donc la relaxation de H5 dans le produit 8b et sont inefficaces dans le produit 7b. Une contribution dipolaire et quadripolaire des noyaux d'azote 14 voisins de ce proton, modifieraient peu cette différence généralement observée.

En outre, la différence des déplacements chimiques du ^{13}C est caractéristique des structures proposées et permet une attribution définitive des deux isomères (Tableau II). En effet, dans les systèmes comportant un cycle triazole fusionné à un autre cycle azoté le C3 (δ = 162-166 ppm) apparaît toujours à champ plus bas que le C3 (δ = 145-150 ppm)[4].

Tableau II : Déplacements chimiques en ppm par rapport à Me_4Si.

	^1H				^{13}C						
Produit	H-5	NH-7	CH_2/ CH_3	Hϕ	C-2	C-3	C-5	C-8	C-8a	CH_2/ CH_3	C-ϕ**
7b	9,08	12,87	4,23	7,31	165,8 (t) $^2J_{CH}$=7,5	-	129,4 (d) $^1J_{CH}$=223,8	152,7 (s)	146,6 (d) $^3J_{CH}$=4,1	34,0	126 5 128,3 128,8 136 9
8b	9,36	14,61	4,20	7,32	-	157,4 (t) $^2J_{CH}$=8	154,4 (d) $^1J_{CH}$=237,5	149,0 (s)	157,8 (d) $^3J_{CH}$=6	31,9	126,7 129,5 136 2
8a	9,34	14,26	2,46	-	-	154,9	154,4	*	*	11,6	-

* non observés ;

** dans l'ordre : positions ortho, méta, para et Cϕ' ; (s) = singulet ; (d) = doublet ; (t) = triplet ; J = constantes de couplage exprimées en Hertz.

L'attribution des différentes résonances qui repose sur l'analyse des couplages carbone-proton, est rigoureuse et identifie les produits 7b et 8b. Dans le cas du produit 8a, nous ne disposons que d'un seul isomère, mais la comparaison des déplacements chimiques avec ceux de 8b (Tableau II) l'identifie sans ambiguïté. L'ensemble des données spectroscopiques (uv, rmn du ^1H et du ^{13}C) est donc cohérent et démontre les structures de 7b, 8a et 8b.

PARTIE EXPERIMENTALE

Remarques générales

Les points de fusion ont été pris au banc de Kofler et ne sont pas corrigés. Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil Cary 118C. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre à impulsions Varian XL 100 à 100 et 25,2 MHz respectivement. Dans les deux cas, les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à ceux des noyaux des groupements méthyles du tétraméthylsilane. Tous les rendements mentionnés sont calculés en produit pur.

Méthyl-3(5)carboxyhydrazino-5(3)triazole1,2,4 6a

Le méthyl-3(5)carbométhoxy-5(3)triazole-1,2,4 3 (10 g, 71 mmoles) est chauffé à reflux dans l'éthanol (200 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (5 g, 0.1 mole). Le solide essoré après refroidissement, recristallise dans le mélange éthanol eau 7/3 pour donner des microcristaux incolores (7 g, 66 %) F = 240°, correspondant à l'hémihydrate du produit attendu.

Anal. Calculé pour $C_4H_7N_5O$, 1/2 H_2O = C, 32,00 H, 5,33 ; N, 46,66.

trouvé : C, 32,05 ; H, 5 30 : N, 46,80.

Benzyl-3(5)carboxyhydrazino-5(3)triazole-1,2,4 6b et β-D-ribofuranosyl-3(5)carboxyhydrazino-5(3)triazole-1,2,4 6c

L'amide voulu 4 ou 5 est chauffé dans l'éthanol à reflux (50 ml pour 1 g de produit à transformer) pendant 24 h en présence de trois équivalents molaires d'hydrate d'hydrazine et le tout est évaporé sous pression réduite.

6b : recristallise dans l'éthanol en microcristaux incolores (Rdt 75 %), F = 192-193°

Anal. calculé pour $C_{10}H_{11}N_5O$ = C, 55,29 : H, 5,07 ; N, 32,25.

Trouvé : C, 55,46 ; H, 5,01 ; N, 31,96.

6c : le résidu de l'évaporation du solvant est chromatographié sur colonne de Séphadex G-10 en éluant avec l'eau. En partant du composé 5 (1 g, 2,9 mmoles) on obtient 250 mg (28 %) d'un composé que nous n'avons pas réussi à cristalliser.

Anal. calculé pour $C_8H_{13}N_5O_5$, C_2H_5OH : C, 39,34 ; H, 6,27 ; N 22 94.

Trouvé : C 39,05 ; H, 5.91 ; N, 23,32.

RMN (DMSOd_6) δppm : H1' (d) 4,75 $J_{1'2'}$ = 5,2 Hz; H2' (t) 4,16 $J_{2'3'}$ = 5,0 Hz ; H3' (t) 3,97 $J_{3'4'}$ = 4,9 Hz ; H4' (d) 3,83 $J_{3'4'}$ = 4,9 Hz ; H5' 3,59 ; H5" 3.47 $J_{4'5'}$ = 4,3 Hz,

$J_{4'5"}$ = 3,9 Hz, $J_{5'5"}$ = 12,0 Hz ; NH et NH_2 7,76-7,55.

Benzyl-2 dihydro-7,8 oxo-8 s-triazolo[1,5-d] triazine-1,2,4 7b et Benzyl-3 dihydro-7,8 oxo-8 s-triazolo[4,3-b]triazine-1,2,4 8b

L'hydrazide 6b (16 g, 70,5 mmoles) est chauffé dans l'orthoformiate d'éthyle au reflux pendant 48 h. Le mélange refroidi fournit un solide qui recristallise dans l'éthanol en microcristaux incolores (8,3 g) correspondant au composé 7b, F = 214°.
Anal. Calculé pour $C_{11}H_9N_5O$ = C, 58,14 ; H, 3,96 ; N, 30,83.
Trouvé : C, 58,04 ; H, 4,16 ; N, 31,03.
UV : pas de bande d'absorption à 232 nm.
Les eaux mères du mélanges réactionnel, jointes à celles de recristallisation du composé précédent, sont évaporées. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice, en éluant avec l'acétate d'éthyle. On récupère ainsi 2,7 g du composé précédent 7b, F = 214° (Rdt = 65,8 %) puis 1,2 g (7,1 %) de son isomère 8b, qui recristallise dans l'éthanol en paillettes incolores, F = 204°.
Anal. Calculé pour $C_{11}H_9N_5O$ = C, 58,14 ; H, 3,96 ; N, 30,83.
Trouvé : C, 58,27 ; H, 4,19 ; N, 31,03.
UV (éthanol) max. nm 233 ; (ε = 12000).
RMN ^{13}C ($DMSOd_5$+D_2O) δppm : CH_2 32,00 ; CHp 126,97 ; CHm et o 128,71 ; Cφ 136,30 ; CH5 154,55 ; C8 148,98 ; C3 157,01 ; C8a 157,93

Méthyl-3 dihydro-7,8 oxo-8 s-triazolo[4,3-d] triazine-1,2,4 8a

Le composé 6a (3 g) dans l'orthoformiate d'éthyle (200 ml) est chauffé à reflux pendant 72 h. Le mélange refroidi, fournit 2,5 g d'un solide correspondant au mélange du produit de départ 6a et du composé attendu 8a, que l'on sépare par chromatographie sur colonne de silice en éluant avec le mélange acétate d'éthyl-éthanol 9/1. On obtient ainsi 0,8 g (25 %) de la méthyl-2 dihydro-7,8 oxo-8 s-triazolo[1,5-d]triazine-1,2,4 8a[6] qui recristallise dans l'éthanol en microcristaux incolores (F > 250°).
Anal. Calculé pour $C_5H_5N_5O$: C, 39,73 ; H, 3,33 ; N, 46,34.
Trouvé : C, 39,97 ; H, 3,39 ; N, 46,23.
UV (éthanol) max. nm 232 ; (ε = 13300).

BIBLIOGRAPHIE ET NOTES

1. R.J. Suhadolnik, "Nucleoside Antibiotics"; Wiley-Interscience : New York (1970).

2a) R. Paul et J. Menschik, U.S. 4,107,308 (Cl.424-249 ; C 07D253/08) 15 Aug. 1978, Appl. 843,175, 18 Oct. 1977 ; 13 pp.

b) J. Menschick et R. Paul, U.S. 4,096,257 (Cl.424-249 ; A61 K31/53), 20 June 1978, Appl. 799,837, 23 May 1977.

c) E. Tihanyi, P. Sohár, O. Fehér et M. Gál, Heterocycles 14, 1291 (1980).

3. T. Huynh-Dinh, J. Igolen, E. Bisagni, J.P. Marquet et A. Civier, J. Chem. Soc., Perk.I, 761 (1977).

4. T. Huynh-Dinh, J. Igolen, J.P. Marquet, E. Bisagni et J.M. Lhoste, J. Org. Chem., 41, 3124 (1976).

5. Le mélange réactionnel après 24 h de chauffage de 6c dans l'orthoformiate d'éthyle à reflux avec ou sans pyridine (conditions dans lesquelles la cyclisation 6b ⟶ 7b + 8b s'effectue), comporte au moins 6 taches visibles en CCM sur silice avec le mélange acétate d'éthyl-méthanol-eau-acide formique 100/25/20/1 comme éluant. Nous n'avons pas réussi à séparer ces produits ni sur colonne de silice, ni sur colonne de Séphadex G-10.

6. La CCM (silice) des eaux mères du mélange réactionnel montre qu'il se forme au moins 5 autres produits que nous n'avons pas réussi à séparer malgré plusieurs essais de chromatographie préparative sur silice, dans diverses conditions. Par ailleurs, si l'on prolonge le temps de chauffage jusqu'à 8 jours, en vue de rendre la réaction plus complète, on observe encore la présence de produit de départ sans augmenter le rendement en 8a et là-encore, nous ne sommes pas parvenus à isoler et caractériser les autres produits formés.

CHAPITRE III

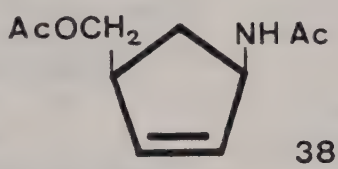
ANALOGUES CARBOCYCLIQUES DE NUCLEOSIDES

La synthèse d'analogues carbocycliques de nucléosides nécessite la synthèse préalable des précurseurs cyclopentaniques convenablement fonctionnalisés qui simulent des sucres naturels. C'est pourquoi, dans un premier temps, sera décrite brièvement la synthèse de ces précurseurs à partir d'un cyclopentène.

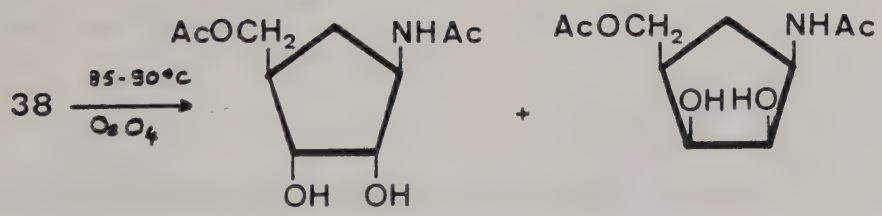
a) Synthèse d'analogues carbocycliques du ribose et du lyxose

La synthèse des analogues carbocycliques de la ribosylamine, de la lyxosylamine et de l'arabinosylamine utilisée dans l'étude qui suit a été effectuée à partir de l'intermédiaire cyclopenténique **38** (acétamido-4α cylopentene 2,3 méthylacétate 1α) déjà mentionné dans la première partie. La dihydroxylation cis par le tétroxyde d'osmium (OsO_4) est obtenue presque quantitativement et conduit au mélange de produits hydroxylés **53** et **54** qui sont des analogues de la ribosylamine et de la lyxosylamine respectivement (cette réaction a été effectuée avec OsO_4 en quantité catalytique régénéré au fur et à mesure de la réaction par la N-oxyde N-méthyl morpholine). La séparation de **53** et **54** est fondée sur le comportement particulier des amides en milieu acide chlorhydrique dilué lorsque le carbone adjacent comporte un hydroxyle cis. Celui-ci, en effet, favorise la migration de l'acyl et donc son hydrolyse.

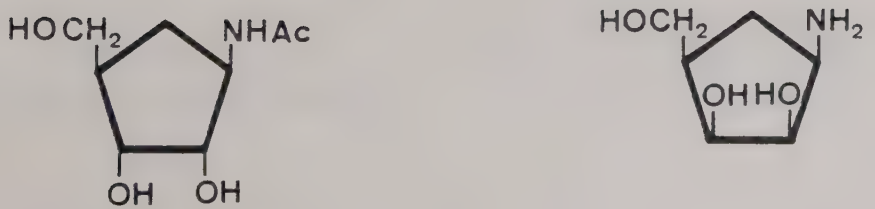
En milieu acide dilué (HCl 2 N ; 70° ; 1 h) **53** et **54** sont donc hydrolysés en **55** et **56** respectivement (Schéma). Ces derniers deviennent alors séparables sur résine échangeuse de cations (sulfonique) puisque l'amide **55** n'est pas retenu par une telle résine tandis que le chlorhydrate de l'amine **56** est retenu. L'hydrolyse de l'acétyle de **55** requiert des conditions plus énergiques (HCl 6N à reflux, 4 h).



38



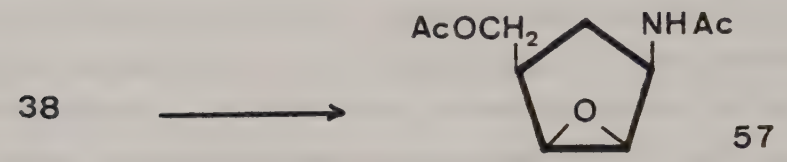
53 **54**

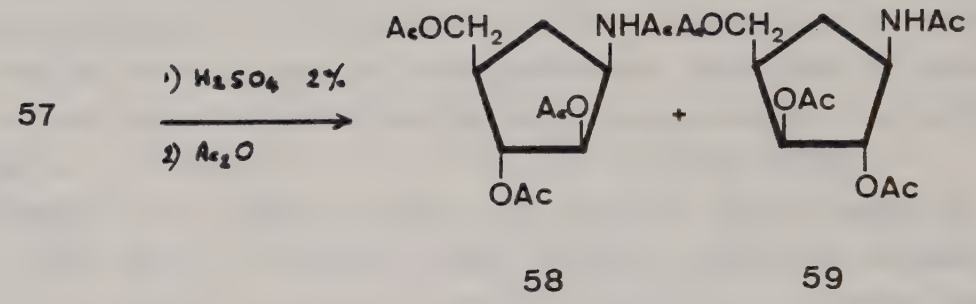


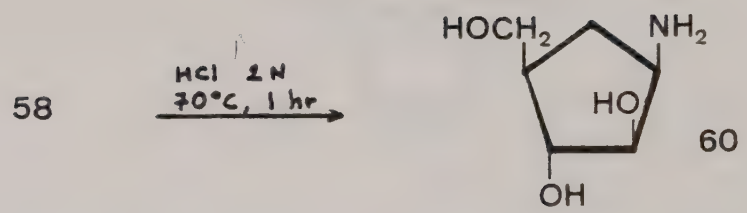
55 (29%) **56** (63%)

b) Synthèse d'un analogue carbocyclique de l'arabinose

Le cyclopentène **38** est époxydé par l'acide métachloroperbenzoïque. L'époxydation est stéréosélective en raison de la présence d'un groupement amide allylique qui favorise la formation de l'époxyde cis **57** avec un rendement de 90 %.







L'hydrolyse de l'époxyde **57** par H_2SO_4 dilué (2 % ; 1 h ; 100°C) suivie d'une acétylation fournit le mélange **58** + **59**. L'isomère majoritaire (**58**) est ensuite purifié par une seule cristallisation dans l'acétate d'éthyle. Ce dernier est ensuite hydrolysé pour conduire à l'analogue de l'arabinosylamine **60** attendu.

EUR. J. MED. CHEM. — CHIM. THER., 1983-18, N° 3, pp. 269-272

Carbocyclic analogs of 6-methyl-tubercidin

Michel LEGRAVEREND (*), Jean-Marc LHOSTE (1), Jean-Marie BECHET (2) and Emile BISAGNI

Institut Curie, Section de Biologie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

(1) *INSERM U. 219.*
(2) *Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France.*

(Received August 19, 1982, accepted January 31, 1983)

Summary. — Some new carbocyclic analogs of tubercidin were prepared for evaluation as antiviral and antitumor agents. *In vitro* testing against herpes simplex type I (strain A44) indicated that no compound in this series exhibited any significant antiviral activity. These compounds exhibited no cytotoxicity against mouse Friend tumor cells and L 1210 cells in culture.

Résumé. — De nouveaux analogues carbocycliques de la tubercidine ont été synthétisés et testés comme agents antiviraux et antitumoraux. Ces produits ont été testés *in vitro* sur le virus de l'herpès simplex de type I (souche A44) et n'ont révélé aucune activité antivirale significative. Ces composés ne présentent aucune cytotoxicité sur les cellules tumorales de Friend et les cellules L 1210 en culture.

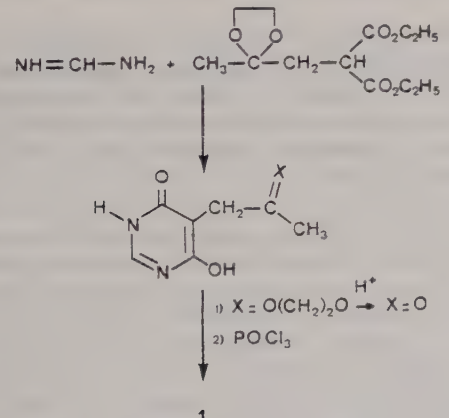
Zusammenfassung. — Neue carbocyclische Analoge des Tubercidins wurden hergestellt und auf ihre antivirale und antitumorale Wirkung untersucht. Diese Substanzen besitzen *in vitro* keine nennenswerte antivirale Wirkung gegen den Typ-I der Herpes simplex-Viren (Stamm A44) und zeigen keine Cytotoxicität gegen L1210- oder Friend Zellkulturen.

Key-words : Tubercidin. — Carbocyclic analogs. — Herpes simplex virus.

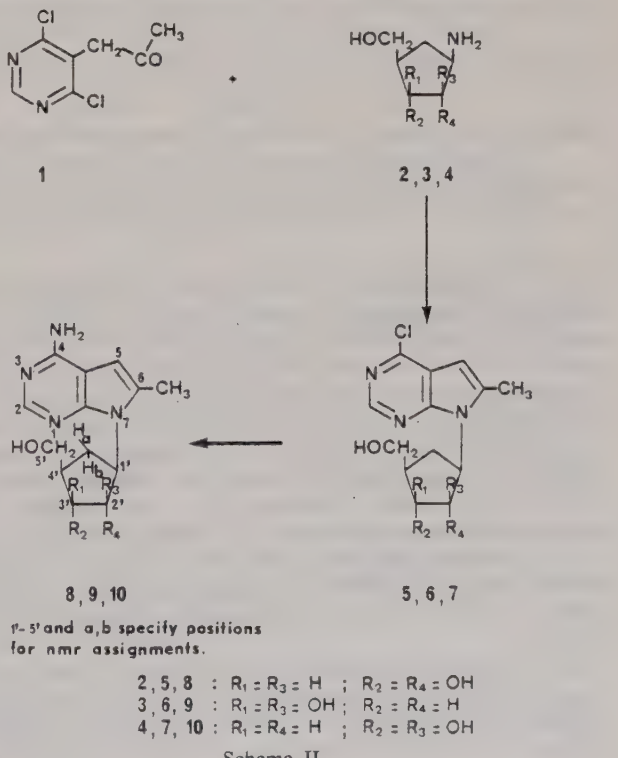
Significant antiviral activity has been recently reported for the carbocyclic analog of arabinofuranosyladenine (1). On the other hand, the nucleoside antibiotic tubercidin is cytotoxic (2) and the closely related pyrrolo [2,3-d] pyrimidine nucleosides toyocamycin and sangivamycin exhibit also antitumor properties (3). From a biochemical viewpoint, this new series of nucleoside analogs presents potential advantages since it is known that tubercidin is neither deaminated by adenosine deaminase (4) nor subject to cleavage by adenosine phosphorylase (5). These data provide a good rationale for the synthesis of carbocyclic analogs of tubercidin as antiviral and/or antitumor agents.

CHEMISTRY

Carbocyclic analogs of ribosylamine **2**, lyxosylamine **3**, and arabinosylamine **4** were obtained as described by Vince and Daluge (6). The preparation of 4,6-dichloro-5-acetonyl pyrimidine **1** was carried out as outlined in Scheme I according to Bisagni *et al.* (7). Condensation of pyrimidine **1** with cyclopentylamines **2**, **3** or **4** afforded the carbocyclic nucleosides **5-7** respectively which were subsequently aminated to give **8-10** (Scheme II) (8). The structure of the synthesized compounds has been clearly established by means of ^1H nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.



Scheme I



Scheme II

(*) Author to whom correspondence should be addressed.

TABLE I. — ^1H *NMR data for compounds* **5-10** *in* Me_2SOd^6 *AT 100 MHz.*

	H_2	NH_2	H_5	OH2'	OH3'	OH5'	$H_{2'}$	$H_{1'}$	$H_{3'}$	$H_{5'}$	$H_{5''}$	CH_3	H_A	H_B	$H_{4'}$
5	8.40 (s)	-	6.34 (q)	4.55 - 4.50 (BR)			4.64	4.56	3.82	3.55	3.45	2.42 (D)	2.05 - 2.10 (BR)		
							$J_{1',2'}$ = 9.0			$J_{5',5''}$ = 10.6		$J_{CH_3,5}$ = 1		$J_{4',5'}$ = $J_{4',5''}$ ~5.7	
							$J_{2',3'}$ = 4.5		$J_{3',4'}$ = 3.5						
6	8.51 (s)	-	6.42 (q)	4.67 (D)	5.28 (D)	4.40 (T)	4.22	4.98	4.02	3.75	3.52	2.52 (D)	2.50-2.55	2.06-2.08	1.92
				$J_{2'OH2'}$ = 5.7	$J_{3'OH3'}$ = 8.1	$J_{5'OH5'}$ = 5.1	$J_{2',3'}$ = 5.0	$J_{1'2'}$=9.7 $J_{1',A}$=9.7 $J_{1',B}$=8.3		$J_{5',4'}$ = 6.5 $J_{5'',4'}$ = 6 $J_{5',5''}$ = 10.5		$J_{CH_3,5}$ = 1			$J_{3',4'}$ = 3.5
7	8.49 (s)	-	6.38 (q)	4.87 (D)	4.88 (D)	4.53 (T)	4.0-3.84	5.06	4.0-3.84	3.69	3.54	2.54 (D)	2.78	2.18	1.88
				$J_{2',OH2'}$ = 4.7	$J_{3',OH3'}$ = 5	$J_{5',OH5'}$ = 5.1	$J_{1',2'}$ = 7.3			$J_{5',5''}$ = 10.4 $J_{4',5'}$ = 5.0 $J_{4',5''}$ = 7.2			$J_{A,B}$ = 12.7 $J_{B,1'}$ = 7.5 $J_{A,1'}$ = 10.7		$J_{4',A}$ = 10.8 $J_{4',B}$ = 8.2
8	7.95 (s)	6.57	6.23 (q)	4.6-4.65	4.48	4.6-4.65	4.66	4.58	3.87	3.56	3.48	2.39 (D)	2.10 - 2.05 (BR)		
			J ~ 1		$J_{3',OH3'}$ = 4.4		$J_{2',3'}$ = 4.5	$J_{1',2'}$ = 8.5		$J_{5',5''}$ = 10.5				$J_{4',5'}$ = $J_{4',5''}$ ~5.5	
9	7.94 (s)	6.85 (s)	6.25 (q)	4.48 (D)	6.51	4.36 (T)	4.20	4.76	3.91	3.72	3.46	2.35 (D)	2.2-2.3	2.0	1.90
				$J_{2',OH2'}$ = 6.0	$J_{3',OH3'}$ = 10.0	$J_{5',OH5'}$ = 5.6	$J_{1',2'}$ = 9.4		$J_{2',3'}$ = 4.6 $J_{3',4'}$ = 4.0	$J_{5',5''}$ = 10.2 $J_{5',4'}$ = 6.8 $J_{5'',4'}$ = 5.8		$J_{CH3,5}$ = 1		$J_{1',B}$ = $J_{1',A}$ ~9	
10	7.96 (s)	6.80 (s)	6.28 (q)	6.02 (BR)	4.88 (D)	4.55 (BR)	3.90	4.85	3.80	3.62 - 3.49		2.39 (D)	2.30	2.10	1.90
			J ~ 1		$J_{3',OH3'}$ ~ 5.0		$J_{2',3'}$ = 3.6	$J_{1',2'}$ = 5.6	$J_{3',4'}$ = 4.2	$J_{5',5''}$ = 10.5 $J_{5',4'}$ ~ 6 $J_{5'',4'}$ ~ 7.5			$J_{1',A}$ = 10.8	$J_{1',B}$ = 8	

A : abbreviations used ; S : singlet ; D : doublet ; T : triplet ; Q : quadruplet ; BR : broad.
Chemical shifts are in ppm from tetramethylsilane and coupling constants J are in Hertz.

The NMR spectra (Table I) agree with the proposed structures. Interestingly, chemical shifts of OH 2' in **10** and OH 3' in **9** are very large as compared to the usual chemical shifts observed for these hydroxyl groups in **5-8**. These results can be interpreted by the existence of a hydrogen bond between OH 2' and N1 in **10** and OH 3' and N1 in **9**. This hydrogen bond can be established only when the hydroxyl group is oriented toward the base as in **9** and **10**. On the other hand, it requires a *syn* conformation of the carbocyclic sugar with respect to the base. This phenomenon is less intense in the chloro derivatives **6** and **7** than in the amino compounds **9-10** for which the electron donating effect of the amino group in position 4 increases the basicity at N1.

As in the usual mass spectral patterns of the naturally occuring nucleosides possessing a C-N glycosidic linkage, intense peaks were found at B + 1 and B + 2 where B represents the base. These peaks were the most intense for both the chloro and the amino derivatives, **5-7** and **8-10** respectively. Due to the absence of the furanosyl oxygen no ions corresponding to B + 30, B + 44 or S (carbocyclic sugar) fragmentations were observed (Table II). All the mass spectra showed the molecular ion M and B + 2 (BHCH = CH_2) ion.

TABLE II. MASS SPECTRAL DATA AT 70 eV, 200° : RELATIVE INTENSITY (%) FOR OBSERVED PEAKS (M/E) OF COMPOUNDS 5 - 10.

M/E COMPD	120	121	132	147	148	149	166	167	168	175	176	194	195	196	278	29
5	-	-	6	-	-	-	22	100	56	-	-	17	3	6	-	3
6	-	-	6	-	-	-	27	100	45	-	-	35	7	12	-	6
7	-	-	6	-	-	-	20	100	31	-	-	39	8	12	-	4
8	21	15	-	10	100	23	-	-	-	15	2	-	-	-	4	-
9	33	17	-	22	100	17	-	-	-	52	9	-	-	-	8	-
10	16	12	-	11	100	24	-	-	-	37	7	-	-	-	5	-

BIOLOGICAL RESULTS

When compound **8-10** were tested (9) for cytotoxicity against Friend tumor cells and L 1210 cells *in vitro*, none exhibited any significant activity when tested at 10^{-4} M.

When **8-10** were tested by means of plaque-inhibition tests against HSV-1 virus (strain A44) in human fibroblasts (MRC 5) they were found to be inactive at 50 and 250 μg/mL (Table III).

TABLE III. EFFECT OF COMPOUNDS 8, 9 AND 10 ON PLAQUE FORMATION BY HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1[A].

Compound	Concentration μg/mL	PFU/½ dish		% of control
	0	71	70	
8	50	60		85
	250	60	57	83
	0	80	62	
9	50	62	56	83
	250[B]	44		62
	0	65	72	
10	50	67	68	99
	250	61	60	88

[A] Confluent monolayers of human diploid fibroblasts (MRC-5 strain) were infected with an appropriate dilution of herpes simplex virus type 1, strain A44, and maintained in medium containing 0.4 % agarose and the indicated concentration of the analog (two dishes for each concentration). After 3 days at 37°, the infected monolayers were fixed in 5 % trichloroacetic acid and plaques were counted after staining with crystal violet.

[B] A slight cytotoxic effect was apparent for compound 9 at 250 μg/mL.

DISCUSSION AND CONCLUSION

To date, only one carbocyclic analog of 7H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidine nucleoside was synthesized (10). The 7-alkyl group of this tubercidin analog was a 4-hydroxymethyl cyclopentylmoiety. Although very little data are available, this compound was reported to be inactive against L 1210 leukemic cells. However, the absence of secondary-2',3' hydroxyl groups to simulate a ribosyl substituent could explain the inactivity of this analog.

In this paper, we report a convenient route to a new series of carbocyclic tubercidin analogs as antitumor or antiviral candidates. Despite the presence of a 6-methyl group, these new compounds are more closely related to tubercidin since they possess the two required secondary hydroxyl substituents. Unfortunately, they were found to be inactive on L 1210 cells *in vitro*, as well as on herpes simplex virus replication. Thus, the lack of significant cytotoxic or antiviral activity in this series of carbocyclic tubercidin analogs seems to be uniform. These results could be explained by poor substrate properties of these derivatives toward nucleoside kinases and/or by the absence of transfer through the plasma membrane but these hypotheses remain to be investigated.

EXPERIMENTAL SECTION

Melting points were taken on a Kofler stage and are not corrected. Proton NMR spectra were obtained with a Varian XL-100 spectrometer operating in the Fourier transform mode. Mass spectra were obtained with a MS 30 AEI Cratos apparatus equipped with a computer Varian 100 MS.

TLC were performed on silica gel (Merck) with ethyle acetate-ethanol 9 : 1, v : v as eluent.

Elemental analyses were carried out by the « Service Central de Microanalyses », CNRS-ICSN (91190, Gif-sur-Yvette, France) and are within ± 0.4 % of theoretical values.

(±)-4-Chloro-6-methyl-7-[2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-cyclopentyl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **5**, **6**, **7** *(Procedure A)*

A mixture of 2.2 g (10.2 mmol) of 4,6-dichloro-5-acetonyl pyrimidine **1**, 1.5 g (10.2 mmol) of amino alcohol **2**, **3** or **4**, 4 g (21 mmol) of tributylamine and 50 mL of water was refluxed for 4 h with stirring. The mixture was then concentrated to dryness and the residue washed with hot hexane (several times) to remove the unreacted pyrimidine **1**.

Crystallization from ethanol or water afforded pure chloro derivatives **5-7**.

(±)-4-Amino-6-methyl-7-[2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-cyclopentyl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **8**, **9**, **10** *(Procedure B)*

A mixture of 1 g (3.36 mmol) of the chloro derivative **5**, **6** or **7** dissolved in methanol (100 mL) (which had been previously saturated with ammonia under anhydrous conditions at 0° C) was heated in a sealed vessel at 120° C for 24 h. After evaporation to dryness, the residue could be crystallized from ethanol affording pure amino derivatives (**8-10**).

(±)-4-Chloro-6-methyl-7-[(1α, 2β, 3β, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **5**

Compound **5** was prepared from **1** and **2** (procedure A). Recrystallization from methanol gave the pure compound (42 %), m.p. 182° C, Rf = 0.41. *Anal.* ($C_{13}H_{16}N_3O_3Cl$) C, H, N, Cl.

(±)-4-Chloro-6-methyl-7-[(1α, 2α, 3α, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **6**

Compound **6** was prepared from **1** and **3** (procedure A). Recrystallization from methanol afforded **6** (69 %), m.p. 160° C, Rf = 0.20. *Anal.* ($C_{13}H_{16}N_3O_3Cl$) C, H, N, Cl.

(±)-4-Chloro-6-methyl-7-[(1α, 2α, 3β, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **7**

Compound **7** was prepared from **1** and **4** (procedure A). Recrystallization from water afforded **7** (77 %), m.p. 182-184° C, Rf = 0.36. *Anal.* ($C_{13}H_{16}N_3O_3Cl$) C, H, N, Cl.

(±)-4 Amino 6-methyl-7-[(1α, 2β, 3β, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **8**

Compound **8** was obtained from **5** (procedure B). Recrystallization from ethanol gave **8** (55 %), m.p. 244-245° C, Rf = 0.10. *Anal.* ($C_{13}H_{18}N_4O_3$) C, H, N.

(±)-4-Amino-6-methyl-7-[(1α, 2α, 3α, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **9**

Compound **9** was obtained from **6** (procedure B). Recrystallization from ethanol gave **9** (80 %) ; m.p. 243-244° C, Rf = 0.08. *Anal.* ($C_{13}H_{18}N_4O_3$) C, H, N.

(±)-4-Amino-6-methyl-7-[(1α, 2α, 3β, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **10**

Compound **10** was obtained from **7** (procedure B). Recrystallization from ethanol-water gave **10** (72 %) ; m.p. 234-235° C, Rf = 0.12. *Anal.* ($C_{13}H_{18}N_4O_3$) C, H, N.

Acknowledgement. — This research was supported by INSERM (CRL n° 813 013). We thank Dr. F. Wendling and Dr. P. Tambourin (INSERM U. 22) for performing cytotoxicity experiments.

REFERENCES AND NOTES

(1) R. Vince and S. Daluge, *J. Med. Chem.*, 1977, **20**, 612.
(2) T. Matsushita, E. K. Ryu, C. I. Hong and M. MacCoss, *Cancer Res.*, 1981, **41**, 2707.
(3) R. J. Suhadolnik, « Nucleosides as Biological Probes », Wiley Interscience, 1979.
(4) R. H. Adamson, D. W. Zaharewitz and D. G. Johns, *Pharmacology*, 1977, **15**, 84.
(5) A. Bloch, R. J. Leonard and C. A. Nichol, *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **138**, 10.
(6) S. Daluge and R. Vince, *J. Org. Chem.*, 1978, **43**, 2311 ; R. Vince and S. Daluge, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 531.
(7) E. Bisagni, J. P. Marquet et J. André-Louisfert, *Bull. Soc. Chim.*, France, 1969, 4338.
(8) M. Legraverend, E. Bisagni, J. M. Lhoste, D. Anker and H. Pacheco, *J. Heterocycl. Chem.*, in press.
(9) C. Ducrocq, F. Wendling, M. Tourbez-Perrin, C. Rivalle, P. Tambourin, F. Pochon and E. Bisagni, *J. Med. Chem.*, 1980, **23**, 1212.
(10) J. A. Montgomery and K. Hewson, *J. Med. Chem.*, 1967, **10**, 665.

CONFORMATIONAL STUDIES OF SOME CARBOCYCLIC NUCLEOSIDE ANALOGS

M. LEGRAVEREND, J.M. LHOSTE[a] and E. BISAGNI

Laboratoire de Synthèse Organique, Institut Curie, Section de Biologie, Bâtiment 110, Centre Universitaire, 91405 ORSAY, France.

Carbocyclic nucleosides are nucleoside analogs in which the tetrahydrofuran ring has been replaced by a cyclopentane ring, as in Aristeromycin, a natural carbocyclic analog of adenosine (1-7). We recently prepared some new carbocyclic analogs of tubercidin in order to evaluate their antiviral and antitumor properties (8) (Fig. 1). These molecules exhibit interesting conformational properties which have been investigated by proton NMR and compared with those of the corresponding tetrahydrofuran nucleoside derivatives.

RESULTS AND DISCUSSION

1) Chemical shifts

The proton NMR spectra have been recorded in DMSO-d_6 at 100 MHz with a Varian XL 100 spectrometer operating in the Fourier transform mode and have been analyzed by standard homonuclear decoupling techniques. Chemical shifts and coupling constants are presented in Table I. They fully support the proposed chemical structures.

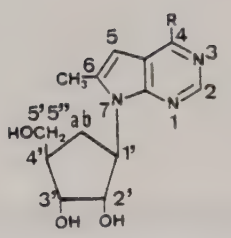
TABLE I

Interestingly, the chemical shift of OH_2, in **3b** and OH_3, in **2b** are exceptionally high. The shift of OH_3, in **2a** is also increased but to a lower extent as compared with the values observed in the case of **1a** or **1b.** This effect can be ascribed to an intramolecular hydrogen bond involving the nitrogen N_1 of the base. Such an hydrogen bond is possible only when the hydroxyl is oriented toward the base and is preferentially located at position 3', as in **2a** or **2b.** This phenomenon is not concentration dependent and is less intense with the chloro derivatives **2a** and **3a** than with the amino compounds **2b** and **3b** where the electron donating effect of the amino group at position 4 increases the basicity at N_1, and, hence, its hydrogen bonding ability. The formation of this intramolecular bond requires a syn conformation about the glycosidic bond. In **1a** and **1b,** the average chemical shifts of the H_5, and $H_{A,B}$ protons of the carbocyclic sugar are lower and have nearer values within each methylene pair, suggesting a preferred anti-conformation about the glycosidic bond which lowers the

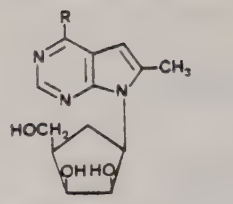
[a] Unité 219 de l'INSERM

Figure 1 : Nucleosides examined in the present study.

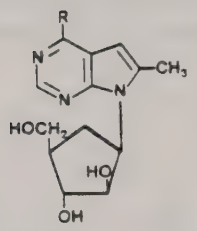
The synthesis of the carbocyclic analogs of tubercidin **1, 2** and **3a,b** has already been published (8). The synthesis of **3c, 4** and **5** is described in the present paper. The various nucleosides are drawn in the preferred syn or anti conformation as deduced in this work. Numbering of carbocyclic derivatives **1, 2** and **3** is specified for **1** and has been used for NMR assign ments.



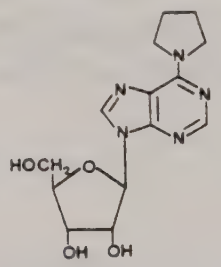
1 (a: R = Cl ; b: R = NH_2)



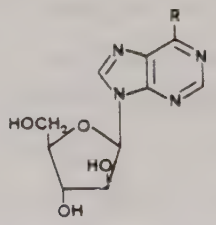
2 (a: R = Cl ; b: R = NH_2)



3 (a: R = Cl; b: R = NH_2; c: R = N⟨ ⟩)



4



5 (a: R = N□ ; b: R = N⟨ ⟩)

TABLE I : ^1H NMR DATA FOR COMPOUNDS 1a - 3b IN Me_2SO-d_6 AT 100 MHZ

	H_2	NH_2	H_5	$OH_{2'}$	$OH_{3'}$	$OH_{5'}$	$H_{2'}$	$H_{1'}$	$H_{3'}$	$H_{5'}$	$H_{5''}$	CH_3	H_A	H_B	$H_{4'}$
1a	8.40 (s)	—	6.34 (q)	4.55 - 4.50 (BR)			4.64 $J_{2',3'}$ = 4.5	4.56 $J_{1',2'}$ = 9.0	3.82 $J_{3',4'}$ = 3.5	3.55 $J_{5',5''}$ = 10.6 $J_{4',5'}$ = $J_{4',5''}$ ~5.7	3.45	2.42 (D) $J_{CH_3,5}$ = 1	2.05 - 2.10 (BR)		
2a	8.51 (s)	—	6.42 (q)	4.67 (D) $J_{2'OH_{2'}}$ = 5.7	5.28 (D) $J_{3'OH_{3'}}$ = 8.1	4.40 (T) $J_{5'OH_{5'}}$ = 5.1	4.22 $J_{2',3'}$ = 5.0	4.98 $J_{1',2'}$ = 9.7	4.02 $J_{3',4'}$ = 3.5	3.75 $J_{4',5'}$ = 6.5 $J_{4',5''}$ = 6 $J_{5',5''}$ = 10.5	3.52	2.52 (D) $J_{CH_3,5}$ = 1	2.52 $J_{1',A}$ = 9.7	2.07 $J_{1',B}$ = 8.3	1.92
3a	8.49 (s)	—	6.38 (q)	4.87 (D) $J_{2',OH_{2'}}$ = 4.7	4.88 (D) $J_{3',OH_{3'}}$ = 5	4.53 (T) $J_{5',OH_{5'}}$ = 5.1	4.0-3.84 —	5.06 $J_{1',2'}$ = 7.3	4.0-3.84 —	3.69 $J_{5',5''}$ = 10.4 $J_{4',5'}$ = 5.0 $J_{4',5''}$ = 7.2	3.54	2.54 (D)	2.78 $J_{A,B}$ = 12.7 $J_{1',B}$ = 7.5 $J_{1',A}$ = 10.7	2.18	1.88 $J_{4',A}$ = 10.8 $J_{4',B}$ = 8.2
1b	7.95 (s)	6.57	6.23 (q) J ~ 1	4.6-4.65 (BR)	4.48 (D) $J_{3',OH_{3'}}$ = 4.4	4.6-4.65 (BR)	4.66 $J_{2',3'}$ = 4.5	4.58 $J_{1',2'}$ = 8.5	3.87 —	3.56 $J_{5',5''}$ = 10.5 $J_{4',5'}$ = $J_{4',5''}$ ~5.5	3.48	2.39 (D)	2.10 - 2.05 (BR)		
2b	7.94 (s)	6.85 (s)	6.25 (q)	4.48 (D) $J_{2',OH_{2'}}$ = 6.0	6.51 (D) $J_{3',OH_{3'}}$ = 10.0	4.36 (T) $J_{5',OH_{5'}}$ = 5.6	4.20 $J_{2',3'}$ = 4.6	4.76 $J_{1',2'}$ = 9.4	3.91 $J_{3',4'}$ = 4.0	3.72 $J_{5',5''}$ = 10.2 $J_{4',5'}$ = 6.8 $J_{4',5''}$ = 5.8	3.46	2.35 (D) $J_{CH3.5}$ = 1	2.25	2.0 $J_{1',B}$ = $J_{1',A}$ ~9	1.90
3b	7.96 (s)	6.80 (s)	6.28 (q) J ~ 1	6.02 (BR)	4.88 (D) $J_{3',OH_{3'}}$ ~ 5.0	4.55 (BR)	3.90 $J_{2',3'}$ = 3.6	4.85 $J_{1',2'}$ = 5.6	3.80 $J_{3',4'}$ = 4.2	3.62 - 3.49 $J_{5',5''}$ = 10.5 $J_{4',5'}$ ~ 6 $J_{4',5''}$ ~ 7.5		2.39 (D)	2.30 $J_{1',A}$ = 10.8	2.10 $J_{1',B}$ = 8	1.90

[A] ABBREVIATIONS USED : S, SINGLET ; D, DOUBLET ; T, TRIPLET ; Q, QUADRUPLET ; BR, BROAD.

CHEMICAL SHIFTS ARE IN PPM FROM TETRAMETHYLSILANE AND COUPLING CONSTANTS J, ARE IN HERTZ.

ring current effects of the base upon these protons. In the 4-piperidino derivatives **3c**, the chemical shift of $OH_{2'}$ is also exceptionally downfield (5.80 ppm) as in the amino derivative **3b**.

2) Nuclear Overhauser effect measurements

The presence of a methyl group at position 6 of the base allowed us to investigate the syn-anti equilibrium about the glycosidic bond through intramolecular nuclear Overhauser effects. A positive enhancement of the $H_{1'}$ resonance measured by integration of the line upon irradiation of this methyl group can be interpreted on the basis of a syn conformation (9). Such a large effect was observed in compounds **2b**, **3b** and **3c** but was not measurable in **3a**. All other NOE's were lower than 5 % (Table II). In

TABLE II

the three former compounds, the relaxation of $H_{1'}$ is thus dominated by a dipole-dipole interaction with the methyl protons. This indicates a rigid structure, i.e. a nearly pure syn conformation, with a maximum internuclear distance of 2.80-2.95 Å (9). On the contrary, the syn-anti equilibrium in compound **3a** should be largely displaced toward the anti conformation, as already suggested by the absence of a large perturbation of the $OH_{2'}$ resonance (< 0.2 ppm).

There is therefore a good correlation between the glycosidic conformation and the ability to form an intramolecular hydrogen bond.

The fact that strong hydrogen bonding able to stabilize the syn conformation occurs in compound **2b** preferentially at $OH_{3'}$ and in compounds **3b** and **3c** at $OH_{2'}$ may appear contradictory with the large NOE enhancement of the $H_{1'}$ resonance observed in both cases upon saturation of the base methyl. This should correspond to similar intranuclear distances involving necessarily some conformational changes in the carbocyclic ring.

TABLE II : NOE experiments were carried out at 100 MHz on degassed solution of **2b**, **3a**, **3b** and **3c** in DMSO-d_6.

Compound	Irradiated	Observed	Percentage of Enhancement*
2b	CH_3	$H_{1'}$	17.5 ± 2
3a	CH_3	$H_{1'}$	< 5
	H_A	$H_{1'}$	< 5
	H_B	$H_{1'}$	< 5
3b	CH_3	$H_{1'}$	17 ± 2
	H_A	$H_{1'}$	< 5
	H_B	$H_{1'}$	< 5
3c	CH_3	$H_{1'}$	17 ± 2

* The integration of the $H_{1'}$ resonance was repeated four independent times and compared with similar experiments using 1000 Hz off-resonance decoupling.

3) Coupling constants

The sugar ring puckering can be estimated by the analysis of the NMR coupling constants. Vicinal couplings of the protons are related to the dihedral angle in the corresponding H-C-C'-H' bonding system according to the Karplus equation (10). They should also depend upon the nature of the substituents. In the present study, however, only the stereochemistry of the substituents of the cyclopentane ring varies and the observed differences should depend mainly on the conformation.

In **1a** and **1b**, $J_{1'2'}$ is large (9 Hz and 8.5 Hz respectively) and should correspond to a trans diaxial configuration of the corresponding protons, i.e. to a $C_{2'}$ endo formation of the ring in which the 2'-carbon is out of the plane formed by the four other carbons. This "envelope-like" conformation is consistent with the observed $J_{2'3'}$ and $J_{3'4'}$ couplings (Table I, $J_{3'4'}$ was not observable for **1b**). The couplings of the nearly degenerated resonances of H_A, H_B and $H_{4'}$ are unfortunately not resolved for these compounds. The large couplings (> 10 Hz) observed for $H_{1'}$, H_A and $H_{4'}$, in compounds **3a** and **3b** (where $J_{4'A}$ is not resolved) should correspond to a conformation in which one of the methylene bridge protons is either strictly cis (eclipsed) or strictly trans with respect to $H_{1'}$ and $H_{4'}$. The trans situation, which should correspond to an out-of-plane situation of the methylene bridge, is not compatible with the observed $J_{1'2'}$ couplings. Compounds **3a** and **3b** thus exhibit an "envelope-like" conformation similar to that of **1a** and **1b**, i.e. with an endo 2'-carbon and H_A cis with respect to both $H_{1'}$ and $H_{4'}$. This conformation is further confirmed by equatorial-axial couplings of the trans $H_{3'}$ and $H_{4'}$ protons ($J_{3'4'}$ = 4.2 Hz in **3b**, not resolved in **3a**) and of the cis $H_{2'}$, and $H_{1'}$ protons ($J_{1'2'}$ = 7.3 and 5.6 Hz).

Intramolecular hydrogen bonding occurs preferentially at $OH_{3'}$ both in **2a** and **2b**. This requires a change in the conformation of the cylopentane ring. The resolved couplings indicate indeed a $C_{3'}$ endo conformation which pushes the hydroxyl group toward the base. The $H_{1'}$ proton is then nearly eclipsed both with one of the protons of the methylene bridge ($J_{1'A}$ = 9.7 and 9 Hz respectively) and with $H_{2'}$ ($J_{1'2'}$ = 9.7 and 9.4 Hz). The puckering at $C_{3'}$ is further confirmed by the cis equatorial-axial conformation of both $H_{3'}$ and $H_{4'}$ ($J_{3'4'}$ = 3.5 and 4.0 Hz) and $H_{3'}$ and $H_{2'}$ ($J_{2'3'}$ = 5.0 and 4.6 Hz). There is therefore a balance between the preferential hydrogen bonding of $OH_{3'}$, and the less stable conformation of the ring with the main puckering at $C_{3'}$ instead of $C_{2'}$.

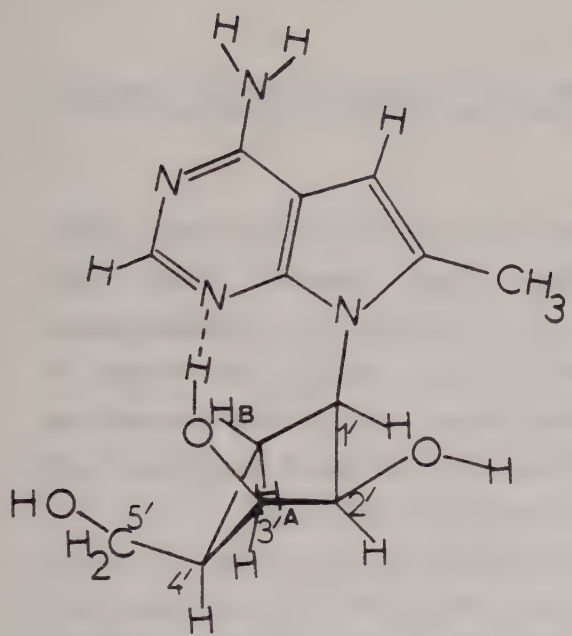
4) Conclusion

Examination of Dreiding models confirms these conformations and further indicates that hydrogen bonding of $OH_{3'}$ must be sterically easier than that of $OH_{2'}$ and that the change of conformation involves very little rotation of the carbocycle around the glycosidic bond as indicated by the NOE experiments.

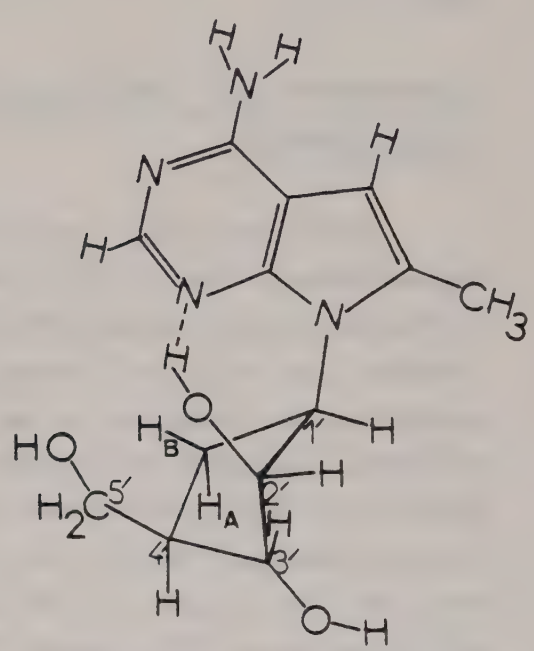
The difference in energy between the two ring conformations should be low and there may exist a thermal equilibrium, especially in the absence of hydrogen

bonding of the cyclopentane moiety with the base. Temperature dependent experiments, using high field NMR in order to resolve all the coupling constants are necessary to investigate more accurately these conformational equilibria.

It is interesting to notice that no such intramolecular hydrogen bond has been observed in the arabinofuranosyl derivatives **5a** and **5b** (to be compared to **3c**) which are known also to present conformers in equilibrium in solution of the types S ($C_{2'}$, endo, $C_{3'}$, exo) $\rightleftharpoons$ N ($C_{2'}$, exo, $C_{3'}$, endo) (11). The hydroxylic protons in these compounds do not exhibit any downfield shift as compared to those of **4**, a furanose analog of $\mathbf{1b}^+$. The possibility of intramolecular hydrogen bonding and consequently of a syn conformation stable in solution is thus specific of the carbocyclic nucleosides.



2b



3b

* Compounds **4**, **5a** and **5b** have a nitrogen at position 5 of the base, but this supplementary nitrogen has a much lower effect on the pK value of N_1 than that of the substitution of an amino group at C_4.

EXPERIMENTAL

Synthesis

6-pyrrolidino-9-(β-D ribofuranosyl) purine **4**

A mixture of 6-chloro-9-(β-D ribofuranosyl) purine (Aldrich) (2 g, 7 mmol) and pyrrolidine (1 g, 14 mmol) in methylcellosolve (30 ml) was refluxed for 1 hr. After evaporation of the solvents under reduced pressure, crystallization from methanol afforded the pure compound.

m.p. 144-146°C (litt. : m.p. : 145°) (12). yield : 80 % ; 1H NMR spectrum (DMSO-d_6) : H_8 (8.34 ; s) ; H_2 (8.20 ; s) ; $H_{1'}$ (5.90 ; d ; J = 6.2 Hz) ; $OH_{2'}$ (5.41 ; d ; J = 5.8 Hz) ; $OH_{3'}$ (5.15 ; d ; J = 4.8 Hz) ; $H_{2'}$ (4.60 ; m ; $J_{2'3'}$ = 4.9 Hz) ; $H_{3'}$ (4.18 ; m ; $J_{3'4'}$ = 3.2 Hz) ; $H_{4'}$ (4.01 ; m) ; $H_{5'}$ $H_{5''}$ (3.72-3.57 ; m ; $J_{4'5'} \sim 3.4$ Hz) ; $CH_2\alpha$ pyrrol. (3.7-3.9) ; $CH_2\beta$ pyrrol. (2.01).

6-pyrrolidino-9-(β-D arabinofuranosyl) purine **5a** and 6-piperidino-9-(β-D arabinofuranosyl) purine **5b**

Both compounds were obtained from 6-chloro-9-(2',3',5'-Tri-0-acetyl-β-D arabinofuranosyl) purine. The 6-chloro derivative was prepared from 9-β-D arabinofuranosylhypoxanthine (Pfanstiehl Lab. Inc.) by acetylation in pyridine/acetic anhydride and subsequent chlorination by DMF-$SOCl_2$ in $CHCl_3$. Substitutions by pyrrolidine or piperidine in excess were performed in dry DMF at room temperature overnight. Evaporation of the solvents and subsequent crystallization from water gave **5a** in 62 % yield, m.p. : 238°C and **5b** in 48 % yield, m.p. : 192-195°C.

1H NMR spectrum (DMSO-d_6) **5a** : H_8 (8.19 ; s) ; H_2 (8.16 ; s) ; $H_{1'}$ (6.28 ; d ; J = 4.2 Hz) ; OH (5.56 ; J = 5.1 Hz) ; OH (5.47 ; J : 4.3 Hz) ; $OH_{5'}$ (5.05 ; t ; J = 5.3 Hz) ; $H_{2'}$, $H_{3'}$, $H_{4'}$ (4.14 ; m) ; $CH_2\alpha$ pyrrol. (3.81 ; m) ; $H_{5'}$, $H_{5''}$ (3.68 ; m) ; $CH_2\beta$ pyrrol. (1.95 ; m). For $C_{14}H_{19}N_5O_4$: Calculated : C, 52.33 ; H, 5.96 ; N, 21.80 ; Found : C, 52.57 ; H, 6.01 ; N, 21.69.

1H NMR spectrum (DMSO-d_6) **5b** : H_8 (8.20 ; s) ; H_2 (8.19 ; s) ; $H_{1'}$ (6.30 ; d ; J = 4.4 Hz) ; $OH_{3'}$ (5.57 ; d ; J = 5.2 Hz) ; $OH_{2'}$ (5.48 ; d ; J = 4 Hz) ; $OH_{5'}$ (5.05 ; t ; J = 5.4 Hz) ; $H_{2'}$, $H_{3'}$, $H_{4'}$, $CH_2\alpha$ piperid. (4.12 ; m) ; $H_{5'5''}$ (3.86-3.60 ; m) ; $CH_2\beta$ and $CH_2\delta$ (1.63 ; m). For $C_{15}H_{21}N_5O_4$: Calculated : C, 53.72 ; H, 6.31 ; N, 20.89 ; Found : C, 53.80 ; H, 6.33 ; N, 20.79.

(±) 4-piperidino-6-methyl 7-[(1α, 2α, 3β, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **3c**

A solution of (±) 4-chloro-6-methyl 7-[(1α, 2α, 3β, 4α)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) cyclopent-1α-yl] (7H) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **3a** (1 g, 3.36 mmol) (8) 10 ml of piperidine, in 25 ml of methylcellosolve was refluxed overnight. The resulting mixture was evaporated to an oil which was subjected to alumina column chromatography ($CHCl_3$-EtOH 9:1, v/v). Trituration with diethylether afforded **3c**. Yield : 38 % : m.p. : 151-154°C.

1H NMR spectrum (DMSO-d_6) : H_2 (8.07 ; s) ; H_5 (6.35 ; q) ; $OH_{2'}$ (5.80 ; d ; J = 4.5 Hz) ; $H_{1'}$ (5.05 ; m) ; $OH_{3'}$ (4.87 ; d ; J = 4.5 Hz) ; $OH_{5'}$ (4.53 ; t ; J = 5.2 Hz) ; $H_{2'}$ (3.89 ; m) ; $H_{3'}$ (3.83 ; m) ; $CH_2\alpha$ pyrrol. (3.85 ; m) ; $H_{5'}$ (3.63 ; m) ; $H_{5''}$ (3.49 ; m) ; CH_3 (2.42 ; d) ; H_A (2.35 ; m) ; H_B (2 ; m) ; $H_{4'}$ (1.88 ; m) ; $CH_2\beta$ pyrrol. (1.63 ; m). For $C_{18}H_{26}N_4O$: Calculated : C, 62.40 ; H, 7.56 ; N, 16.17 ; Found : C, 62.57 ; H, 7.48 ; N, 16.28.

REFERENCES

1. R. Vince and S. Daluge, J. Med. Chem. 20, 612 (1977).
2. H. Lee and R. Vince, J. Pharm. Sci. 69, 1019 (1980).
3. Y.F. Shealy and C.A. O'Dell, J. Het. Chem. 17, 353 (1980).
4. J.A. Montgomery, S.J. Clayton, J.H. Thomas, W.M. Shannon, G. Arnett, A.J. Bodner, In-Kyung Kion, G.L. Cantoni and P.K. Chiang, J. Med. Chem. 25, 626 (1982).
5. W.S. Shannon, G. Arnett, L. Westbrook, Y.F. Shealy, C.A. O'Dell and R.W. Brockmein, Antimicrob. Agents Chemother. 20, 769 (1981).
6. Y.F. Shealy and J.D. Clayton, J. Am. Chem. Soc. 88, 3885 (1966).
7. T. Kishi, M. Muroi, T. Kusaka, M. Nishikawa, K. Kamiya and K. Mizuno, Chem. Pharm. Bull. 20, 940 (1972).
8. M. Legraverend, J.M. Lhoste, J.M. Bechet and E. Bisagni, Eur. J. Med. Chem., 18 269 (1983)
9. J.H. Noggle and R.E. Schirmer. The Nuclear Overhauser Effect Chemical Applications, Academic Press, 167 (1971).
10. F.E. Hruska, A.A. Grey and I.C.P. Smith, J. Am. Chem. Soc. 92, 4088 (1970).
11. C. Altona and M. Sundaralingam, J. Am. Chem. Soc. 94, 8205 (1972).
12. H. Vorbrüggen, Angew. Chem. Internat. Edit. 11, 304 (1972).

ABSTRACT

Proton NMR spectra of some carbocyclic nucleoside analogs of tubercidin have been analyzed at 100 MHz in DMSO-d_6 solution.

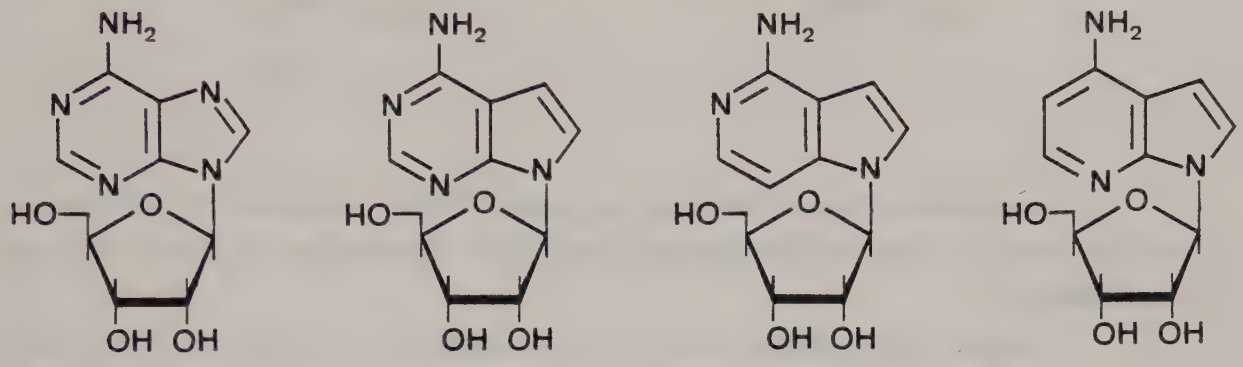
The spectral characteristics and nuclear Overhauser effects indicate a preferential *syn* conformation about the glycosidic bond when a hydroxyl group, oriented toward the base, is available for intramolecular hydrogen bond formation.

CHAPITRE IV

ESSAIS D'OBTENTION DE NUCLEOSIDES CARBOCYCLIQUES AZA-7 INDOLIQUES A PARTIR DES AZA-5 INDOLES, SUIVANT UN NOUVEAU REARRANGEMENT

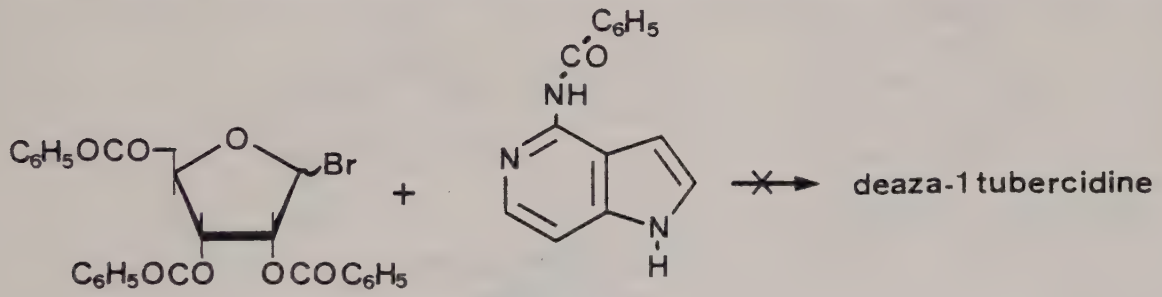
INTRODUCTION

La déaza-1 tubercidine ainsi que la déaza-3 tubercidine sont deux nucléosides encore inconnus* dont la synthèse serait justifiée par leur analogie de structure avec l'adénosine et la tubercidine. Il en va de même pour leurs homologues carbocycliques.



adenosine — tubercidine — deaza-1 tubercidine — deaza-3 tubercidine

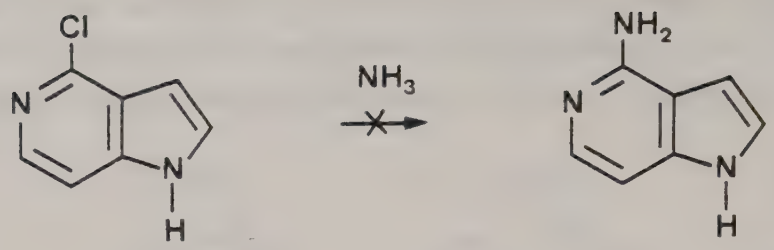
La condensation du tri-O-benzoyl-2,3,5 bromo-1-D-ribofurannose sur l'amino-4 aza-5 indole bloqué sous sa forme benzamido, ne conduit pas à la déaza-1 tubercidine.



En effet, l'alkylation ne s'effectue pas sur le sommet 1, mais sur le sommet 5 (C. Ducrocq, E. Bisagni, J.M. Lhoste, J. Mispelter et J. Defaye, Tetrahedron 32, 773 (1976)).

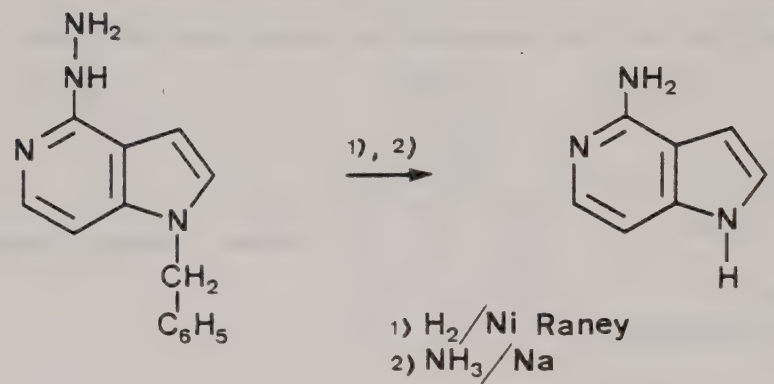
Cependant, ce problème d'alkylation qui s'effectue sur le noyau pyridinique ne constitue pas la seule difficulté d'accès à ce type de structure. Ainsi, les essais de substitution directe du chloro-4 aza-5 indole par l'ammoniac sous pression se sont soldés par un échec (référence citée plus haut).

* La déaza-1 tubercidine vient d'être synthétisée (J. Med. Chem. 25, 1258 (1982)) et a été trouvée inactive sur les cellules L1210 et S180.

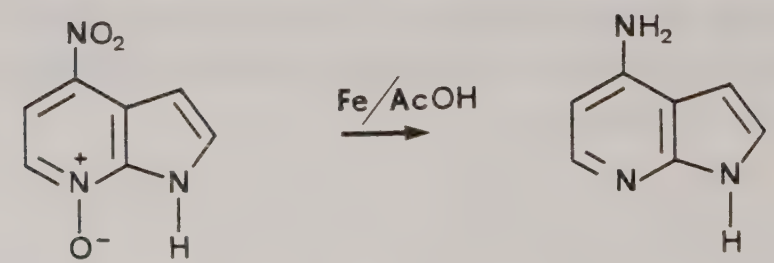


Des résultats comparables qui confirment l'échec précédent ont d'ailleurs été décrits récemment par des auteurs américains (S.W. Schneller et J.K. Luo, J.O.C. 45, 4045 (1980)).

L'amino-4 aza-5 indole n'avait pu être obtenu que de façon indirecte à partir du benzyl-1 chloro-4 aza-5 indole, par substitution au moyen de l'hydrazine, hydrogénation en amine correspondante par le nickel de Raney et enfin débenzylation par le sodium dans l'ammoniac liquide.



De manière comparable, l'amino-4 aza-7 indole a été préparée par voie indirecte et en faible rendement (30 %) en réduisant le nitro-4 N-oxide-7 aza-7 indole.



Cet ensemble de faits, souligne les difficultés d'obtention des dérivés N-1 substitués aussi bien des aza-5 que des aza-7 indoles et par conséquent des nucléosides correspondants.

C'est dans ce contexte que la découverte du réarrangement des aza-5 en aza-7 indoles décrit dans l'article suivant a particulièrement retenu notre attention.

Reprinted from The Journal of Organic Chemistry, 1982, 47, 1500.
Copyright © 1982 by the American Chemical Society and reprinted by permission of the copyright owner.

New Heterocyclic Rearrangement: Transformation of 1-Substituted 4-(Alkylamino)-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines into 1-Substituted 4-(Alkylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridines (5-Aza- to 7-Azaindoles)

Emile Bisagni,*[†] Michel Legraverend,[†] and Jean-Marc Lhoste[‡]

Laboratoire de Synthèse Organique, Institut Curie, Section de Biologie, and Unité 219 de l'Inserm, 91405 Orsay, France

Received October 29, 1981

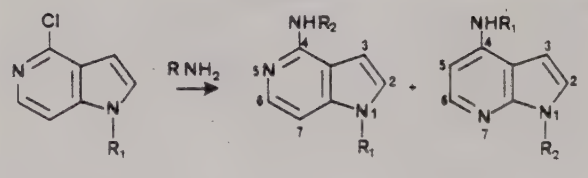
Substitution of 1-alkyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines by primary alkylamines in excess afforded the expected 1-alkyl-4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines and their 1-alkyl-4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine isomers resulting from the reversible isomerization of the preceding compounds.

In 1970 we described[1] a synthesis of 1-substituted 4-chloro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines (5-azaindoles). Nucleophilic displacement of the chlorine atom was then reported to give the expected 4-substituted products, and this reaction was used to prepare various 4-anilino-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines.[2] The structure of a derivative of 1-benzyl-4-amino-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine obtained by reduction of the corresponding hydrazine was established by X-ray crystallography,[3] and the structure of various 4-substituted 1-alkyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine derivatives seemed to be unambiguous.

Surprisingly, a recent experiment showed that substitution of 1-methyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine by benzylamine and other primary alkylamines can afford a mixture of two isomeric compounds. Reinvestigation of this reaction allowed us to establish conditions which lead to normal substituted 1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines and their 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (7-azaindoles) isomers and to specify in what cases isomerization can be observed.

Substitution of 1-methyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]-pyridine (1) by various primary alkylamines in excess takes place by boiling the mixture in 2-methoxy- or 2-ethoxyethanol (Scheme I). For completion of the reaction, heating with benzylamine, 2-hydroxypropylamine, and 3-hydroxypropylamine required at least 1 week. In every

Scheme I[a]



1 2 3

[a] a, $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2C_6H_5$; b, $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2CH(OH)CH_3$; c, $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2CH_2CH_2OH$; d, $R_1 = R_2 = CH_2C_6H_5$.

[†] Laboratoire de Synthèse Organique.
[‡] Unité 219 de l'Inserm.

(1) Bisagni, E.; Bourzat, J. D.; André-Louisfert, J. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 2087.
(2) Bisagni, E.; Bourzat, J. D.; Marquet, J. P.; Labrid, C.; Delort, P.; Le Ridant, A. *Chim. Ther.* **1973**, *5*, 559.
(3) (a) Ducrocq, C.; Bisagni, E.; Lhoste, J. M.; Mispelter, J.; Defaye, J. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 773. (b) Ducruix, A.; Riche, C.; Pascard, C. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 51.
(4) Ducrocq, C.; Bisagni, E.; Rivalle, C.; Mispelter, J. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1* **1979**, 135.
(5) Marquet, J. P.; Montagnier, L.; Gruest, J.; Bourzat, J. D.; André-Louisfert, J.; Bisagni, E. *Chim. Ther.* **1971**, *6*, 427.
(6) Schneller, S. T.; Luo, J. K. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4045.

Table I. 1*H*-Pyrrolo[3,2-*c*]pyridine (2a–d) and 1*H*-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (3a–d) Characteristic ^{1}H NMR Chemical Shifts[a] at 100 MHz in Me_2SO-d_6

	chemical shift[b,c]									
compd	N1 CH_3	N1 CH_2	H2	H3	N4 CH_2	N4 CH_3	H5	H6	H7	$J_{3,7}$[b]
2a	3.69 (s)		7.08 (3.1)	6.68	4.70 (d, 6)			7.63 (6.1)	6.67	0.8
3a		5.36 (s)	7.16 (3.6)	6.55		2.85 (d, 4.9)	6.11 (5.5)	7.88		
2b	3.69 (s)		7.08 (3)	6.62	3.33 (m)			7.60 (6)	6.66	0.8
3b		4.04 (s)	7.10 (3.5)	6.47		2.84 (d, 4.9)	6.08 (5.5)	7.84		
2c	3.67 (s)		7.06 (3.2)	6.59	3.48 (m)			7.61 (6)	6.63	0.8
3c		4.19 (t)	7.10 (3.5)	6.49		2.84 (d, 5)	6.08 (5.5)	7.85		
2d			7.2–7.3	6.73	4.68 (d)			7.57	6.69	0.5
3d		5.36 (s)	7.2 (3.4)	6.66	4.48 (d, 6)		6.10 (5.5)	7.80		

[a] Chemical shifts in parts per million from Me_4Si as an internal reference. [b] $J_{3,7}$ represents the zig-zag coupling between H3 and H7 in hertz. Other coupling constants between vicinal protons are given in parentheses in hertz. [c] s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet.

case, purification by alumina column chromatography affords two compounds corresponding to the normal substituted products **2a–d** and to their 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]-pyridine isomers **3a–d**, respectively.

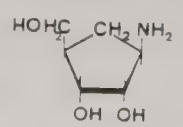
The structures of the 1*H*-pyrrolo[3,2-c]pyridine **2** and 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives **3** have been assigned on the basis of ^{1}H NMR data. As shown on Table I, the existence of a small coupling constant between 3-H and 7-H results from a zig-zag coupling which is characteristic of the 1*H*-pyrrolo[3,2-c]pyridine system. Further evidence of the two structures comes from the methyl proton signals which appear as a sharp singlet at 3.67–3.69 ppm in 1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine derivatives **2** and as a doublet at 2.84–2.85 ppm [J(NH–CH_3) = 4.9–5 Hz] in 1*H*-pyrrolo-[2,3-*b*]pyridine compounds **3**. As expected, this doublet becomes a singlet by exchange with D_2O. The comparison of chemical shifts and coupling constants of the other protons of the molecules is in full agreement with these assignments (Table I). Additional clear distinction between the two ring systems is provided by their UV spectra (Table II).

The presence of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives **3** in the resulting mixture starting from 1-methyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine (**1**) shows that a secondary reaction takes place by opening and subsequent closing of the pyrrole nucleus of intermediate products **2**.

In order to specify the required conditions of this new rearrangement, we have examined the possible transformation of compounds **2** and **3** with primary amines in the presence and absence of water and/or hydrochloric acid.

No rearrangement could be observed by boiling the amine in methoxy ethanol plus water or aqueous hydrochloric acid solution. On the contrary, heating of the hydrochlorides of **2** and **3** with primary amines (conditions which are closely related to those of the direct substitution of compound **1**) allowed us to observe the rearrangements **2** → **3** and **3** → **2**. In every case, the reaction leads to an equilibrium indicating that the isomerization is a reversible one. However, although the primary amine brings about the transformation of the studied 4-amino-1*H*-pyrrolo-[3,2-*c*]pyridines **2** or 4-amino-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (**3**) hydrochlorides, it acts only as a "catalyst". Thus, reaction of **2c**·HCl with benzylamine gave a mixture of **2c** and **3c** and no traces of benzyl-substituted compounds.

Nevertheless, probably due to the weak stability of amine **4**[7] under the reaction conditions necessary to promote the expected substitution and isomerization, this reaction was not applicable to the synthesis of a 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine nucleoside analogue.



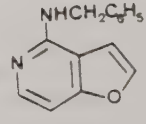
4

Table II

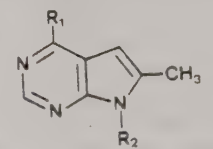
compd[a]	UV,[b] λ nm (ε)	yield,[d] %	mp,[e] °C
2a	277 (17 550)	43	94 (C)
3a	271 (11 700), 295 (15 500), 304 (13 400)	23	180 (C)
2b	277 (15 000)	50.6	116 (T)
3b	271 (9400), 295 (12 700), 304 (10 600)	16.9	128 (C)
2c	277 (16 500)	45.2	120 (T)
3c	271 (9400), 295 (13 500), 304 (11 800)	4.3	144 (T)
2d	277 (21 180)	25.1	152–153.5 (E)
3d[c]	273 (11 600), 297 (16 200), 306 (14 400)	28	197 (X)

[a] Satisfactory analytical data (±0.4% for C, H, N, and Cl) were obtained for all compounds listed in the table. [b] Absorption spectra were recorded on samples dissolved in ethanol. [c] Only the hydrochloride of compound 3d could be crystallized. [d] Indicated yields correspond to substitution experiments (method A in Experimental Section). [e] Solvent: C, cyclohexane; T, toluene; E, ethanol; X, xylene.

We also tried to isomerize the hydrochlorides of 4-(benzylamino)furo[3,2-*c*]pyridine (**5**) and 4-(benzylamino)-6-methyl-7-(2,3-dihydroxypropyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (**6a**) and its isomer **6b**. In neither case was a reaction observed. TLC (ethyl acetate-ethanol 8-2 v:v) showed no transformation of the starting compound.



5



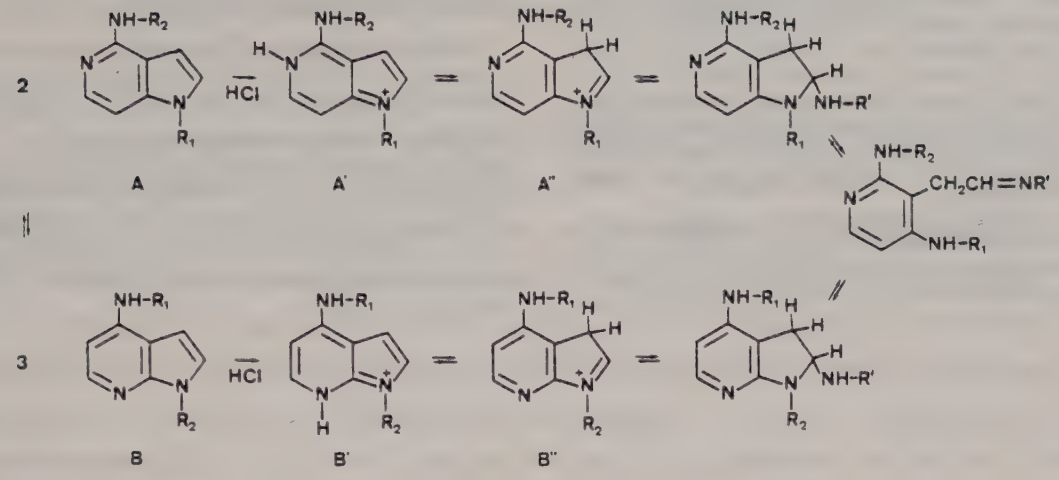
6

a R_1 = $NHCH_2$-C_6H_5 ; R_2 = CH_2-CHOH-CH_2OH
b R_1 = $NHCH_2$-CHOH-CH_2OH ; R_2 = CH_2-C_6H_5
c R_1 = Cl ; R_2 = CH_2-CHOH-CH_2OH
d R_1 = Cl ; R_2 = CH_2-C_6H_5

For interpretation of this new reversible isomerization, we propose the mechanism shown in Scheme II. Pro-

(7) Shealy, Y. F.; Clayton, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3075.

Scheme II



tonation exchange experiments carried out with A and B in D_2O–DCl solution showed that the deuteration of the pyridine heterocycle occurred immediately, giving A′ and B′, which present characteristic ^1H NMR chemical shifts (δ) and coupling constants (hertz): **2c**, 6.98 (6-H), 6.50 (7-H), $J_{6,7}$ = 7.2 Hz; **3c**, 6.20 (5-H), 7.59 (6-H), $J_{5,6}$ = 7.4 Hz.

On the other hand, a slow exchange of 3-H was observed, leading to totally 3-deuterated starting compounds (half-life 90 min in **2c** and 60 min in **3c**). This is consistent with the postulated intermediates A″ and B″ and the proposed mechanism. With furo[3,2-*c*]pyridine derivative **5**, no deuteriation of 3-H was observed. In this case, the absence of an intermediate able to react with the nucleophile might explain why no rearrangement could be observed. From this viewpoint it is more surprising that no rearrangement could be detected with pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines although 5-H was exchangeable (half-life 40 min). We have not found a satisfactory interpretation for this result.

To our knowledge, such an opening (and ring closure) reaction of a pyrrole nucleus has not previously been reported. However, the ring opening of certain quaternarized pyridines by primary amines[4] and the well-known Dimroth rearrangement of various purine and pyrimidine derivatives, which proceeds by a N–C bond cleavage, can be compared to this new transformation. In view of our present results, we have reexamined the structure of various 4-amino-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridine derivatives already described. All 1-methyl-4-anilino-1*H*-pyrrolo-[3,2-*c*]pyridines[2] as well as 4-amino-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]-pyridine derivatives resulting from the substitution by secondary amines such as pyrrolidine, morpholine, and piperidine[1] correspond to the published structures. Only the compounds previously reported in ref 1 and 5 as **2a** and **2d** were misformulated and correspond to their **3a** and **3d** isomers, respectively. The compounds **2a** and **2d**, which were not then isolated, are now described in this paper.

In summary, this work showed that two compounds previously described as 4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines **2** were misformulated. It established the possibility of transformation of 1-substituted 4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines **2** into their 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine isomers **3**. This reversible reaction was observed with four 4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]-pyridine hydrochlorides and primary alkylamines, but the required conditions of this new rearrangement ruled out its possible application to unstable (or only slightly stable) primary alkylamines. This isomerization seems to be limited to the 1-substituted 4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines as starting materials. Nevertheless, it could be useful for synthesis of some new 4-aminopyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives of type **3** which have been recently reported as inaccessible by substitution of the corresponding chloro derivatives.[6]

Experimental Section

Elemental analyses were performed by the Service Central d'Analyse, CNRS, Vernaison, France. Nuclear magnetic resonance spectra were recorded with a Varian XL-100 at 100 MHz in Me_2SO-d_6 with Me_4Si as an internal standard. UV spectra were taken on a Cary Model 118C. Column chromatography was done on neutral alumina from Prolabo. Melting points were determined on a Koefler apparatus and are not corrected.

Method A (Substitutions). All substitutions were performed by boiling the 1-alkyl-4-chloro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines (6 mmol) with various amines (12 mmol) in 2-methoxyethanol (15 mL) for 8 days. The mixture was then evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in an aqueous solution of sodium hydroxide (20 mmol) and extracted with chloroform (2 × 50 mL). The viscous residue which contained the two isomers (7-azaindole and 5-azaindole) was then chromatographed on an alumina column (50 g; 1.5 × 44 cm) with chloroform for **2a** and **3a**, with ethylacetate–ethanol (95:5 v/v) for **2b,c** and **3b,c**, and with toluene–ethylacetate (9:1 v/v) for **2d** and **3d**.

Method B (Isomerizations). Rearrangements of 1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines into 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridines and vice versa were performed as follows. The starting compound (2 mmol) was dissolved in concentrated hydrochloric acid (10 mL), and the mixture was evaporated under reduced pressure and dried by evaporation in the presence of absolute ethanol. It was then refluxed in 15 mL of 2-ethoxyethanol for 8 days in the presence of 2 mmol of the primary amine corresponding to the 4-substituent of 1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]pyridines **2a–d** or to the 1-substituent of 4-(alkylamino)-1*H*-pyrrolo[2,3-b]pyridines **3a–d**. The resulting mixture was treated as described above (method A), and the two isomers were separated by chromatography. The ratio of the rearranged compound vs. the starting compound was always near 1. One must mention that rearrangement assays starting with **2** or **3** and using benzylamine led exclusively to **3** and **2**, respectively.

4-(Benzylamino)furo[3,2-*c*]pyridine (**5**) was synthesized as already described.[8]

4-Chloro-6-methyl-7-(2,3-dihydroxypropyl)-7*H*-pyrrolo-[2,3-*d*]pyrimidine (6c). A solution of 2.05 g (1 mmol) of 5-acetonyl-4,6-dichloropyrimidine[9] in water (30 mL) was stirred at 100 °C for 4 h with 1.81 g (2 mmol) of 3-amino-1,2-propanediol. Cooling of the resulting mixture left **6c** as a solid which was

(8) Bourzat, J. D.; Bisagni, E. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 1727.
(9) Bisagni, E.; Marquet, J. P.; André-Louisfert, J. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1969**, 4338.

recrystallized from ethanol (91%); mp 154 °C. Anal. Calcd for $C_{10}H_{11}N_3O_2Cl$ (mol wt 241.67): C, 49.69; H, 5.00; N, 17.38; Cl, 14.66. Found: C, 49.68; H, 5.14; N, 17.36; Cl, 15.02.

4-(Benzylamino)-6-methyl-7-(2,3-dihydroxypropyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (6a). A solution of **6c** (1 g, 4.1 mmoles) in 2-methoxyethanol (40 mL) was stirred for 4 h under reflux with 877 mg (8.2 mmol) of benzylamine. After evaporation of the mixture under reduced pressure, the residue was crystallized twice in water yielding **6a**: 66%; mp 155 °C. Anal. Calcd for $C_{17}H_{20}N_4O_2$ (mol wt 312.36): C, 65.36; H, 6.45; N, 17.94. Found: C, 65.34; H, 6.34; N, 18,23.

7-Benzyl-6-methyl-4-[(2,3-dihydroxypropyl)amino]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (6b). A solution of **6d**[9] in 2-methoxyethanol was treated as described above with 3-amino-1,2-propanediol. An analytical sample of **6b** was obtained by crystallization from ethanol, giving colorless crystals: mp. 194 °C; 74%. Anal. Calcd for $C_{17}H_{20}N_4O_2$ (mol wt 312.34): C, 65.36; H, 6.45; N, 17.94. Found: C, 65.18; H, 6.38; N, 18.04.

Acknowledgment. This investigation was supported in part by funds from the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (CRL No. 813 013.

Registry No. 1a, 27382-01-0; **1d**, 35636-10-3; **2a**, 27382-09-8; **2a**·HCl, 80765-61-3; **3a**, 80765-62-4; **3a**·HCl, 80765-63-5; **2b**, 80765-64-6; **2b**·HCl, 80765-65-7; **3b**, 80765-66-8; **3b**·HCl, 80765-67-9; **2c**, 80765-68-0; **2c**·HCl, 80765-69-1; **3c**, 80765-70-4; **3c**·HCl, 80765-71-5; **2d**, 35801-12-8; **2d**·HCl, 80765-72-6; **3d**·HCl, 80765-73-7; **5**, 46802-94-2; **6a**, 80765-74-8; **6b**, 80765-75-9; **6c**, 80765-76-0; **6d**, 26035-89-2; 5-acetonyl-4,6-dichloropyrimidine, 26035-69-8; 3-amino-1,2-propanediol, 616-30-8.

DISCUSSION DU MECANISME DE CE REARRANGEMENT

Le réarrangement des aza-5 indoles en aza-7 indoles suppose l'ouverture et la refermeture du noyau pyrrole comme indiqué sur le schéma II. Cette ouverture ne se produit que sur un aza indole protoné et en présence d'une amine primaire. Cette isomérisation est lente puisque pour atteindre l'équilibre, elle requiert au moins 8 jours dans le méthoxy-2 éthanol à ébullition (Eb = 125°). L'utilisation de solvants à point d'ébullition plus élevé (éthoxy-2 éthanol, Eb = 135°) n'améliore pas le rendement de la réaction pour un temps intermédiaire comparable. S'il y a accélération de la transformation, elle doit être compensée par la destruction du ou des produits formés.

En effet, avec le buthoxy-2 éthanol (Eb = 171°) nous avons observé (CCM) la disparition du composé de départ sans pour autant retrouver les dérivés attendus.

A priori, on pouvait aussi penser que le rapport entre la valeur du pK de la base utilisée pour promouvoir le réarrangement et la valeur du pK du dérivé hétérocyclique étudié pouvait avoir une importance.

Nous avons donc examiné ce problème en étudiant l'effet du changement de l'amine primaire. Par ailleurs, nous avons également envisagé la possibilité de provoquer le même type de réarrangement sur des dérivés amino-hétérocycliques apparentés aux aza-indoles.

TABLEAU III

pK des bases étudiées

base	pK_B
n propylamine, n butylamine	3,4
benzylamine	4,7
aniline	9,4
2c	5,00
3c	6,90
5	6,15
6a, 6b	8,10

Pour essayer de mettre en évidence un effet éventuel du pK de la base promotrice du réarrangement, nous avons remplacé la benzylamine par l'aniline dans une expérience de réarrangement de 2a.

Avec l'aniline, on observe en CCM une trace de produit réarrangé après 8 jours dans le méthoxy-2 éthanol à ébullition mais le traitement du mélange réactionnel conduit exclusivement à la récupération du composé de départ. La différence de pK entre l'aniline et la benzylamine semble montrer que ce facteur n'est pas indifférent. Toutefois, la réaction ne s'effectue pas lorsqu'on effectue un essai de réarrangement sur la base aza indolique libre. Pour cette raison, il est difficile d'interpréter l'effet de la force de la base promotrice.

Commentaire sur le Tableau II

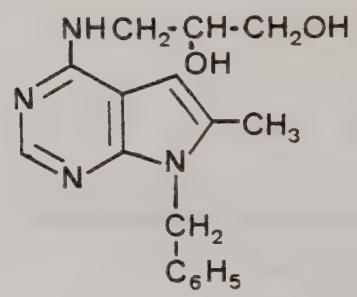
L'interprétation du réarrangement, donnée sur le Tableau II prend en compte essentiellement les formes protonées considérées comme les intermédiaires clés de la réaction. Ces formes protonées intermédiaires sont d'ailleurs rendues probables par les expériences de deutériation réalisées en présence de D_2O=DCl mais il est difficile de comprendre comment une amine primaire de pK_B = 4,7 comme la benzylamine peut réarranger le composé 3c dont le pK_B est de 6,9 (ou son isomère 2c de pK_B = 5).

Nous avons néanmoins tenté d'effectuer des réarrangements de même type en partant de bases hétérocycliques différentes des aza-indoles.

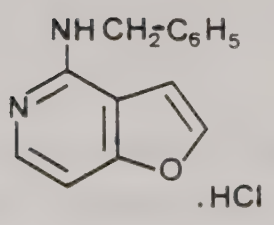
Dans ce but, nous avons préparé les pyrrolo [2,3-d] pyrimidines 6a et 6b et tenté le réarrangement au départ de l'un ou l'autre composé. Nos essais ont toujours été négatifs (récupération intégrale du composé de départ et aucune trace de produit réarrangé en chromatographie sur couche mince).

Avec la benzylamino-4 furo [3,2-c] pyridine 5 nous n'avons observé aucun réarrangement en benzyl-1 oxo-4 aza-7 indole.

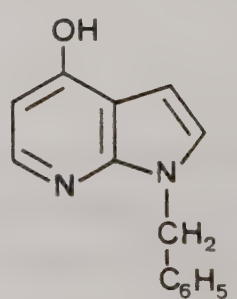
6a



6b



5



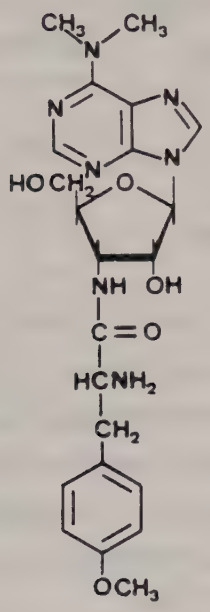
En conclusion, la nouvelle réaction mise en évidence n'est pas applicable à la synthèse de nucléosides carbocycliques dérivés des aza-7 indoles.

Elle est par ailleurs spécifique des noyaux aza-5 et 7 indoliques. Elle est néanmoins utile pour synthétiser des amino-4 pyrrolo [2,3-b] pyridine (aza-7 indoles) que l'on peut envisager de substituer par des sucres pour accéder par exemple à une déaza-3 tubercidine.

CHAPITRE V

SYNTHESE D'UN NOUVEL ANALOGUE CARBOCYCLIQUE DE LA PUROMYCINE

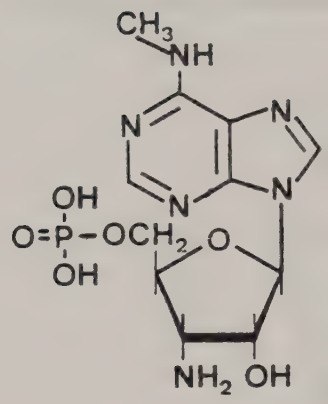
La puromycine est un nucléoside naturel, synthétisé par Streptomyces alboniger (1). C'est un antibiotique à spectre large dont la structure est représentée ci-dessous (il est particulièrement actif sur des bactéries gram positives).



PUROMYCINE

Cette structure ressemble à un aminoacyl-tRNA et pour cette raison inhibe la synthèse des protéines aussi bien in vivo qu'in vitro. La puromycine a été beaucoup utilisée au laboratoire par les biochimistes et a permis d'étudier le mécanisme de la formation de la liaison peptidique au niveau des ribosomes (voir par ex. les revues de Suhadolnik 2,3). L'utilisation d'analogues synthétiques de puromycine comportant un groupe azide à la place du groupe méthoxy a permis, par ailleurs, de mettre en évidence les protéines ribosomales qui participent à la formation de la liaison peptidique (4).

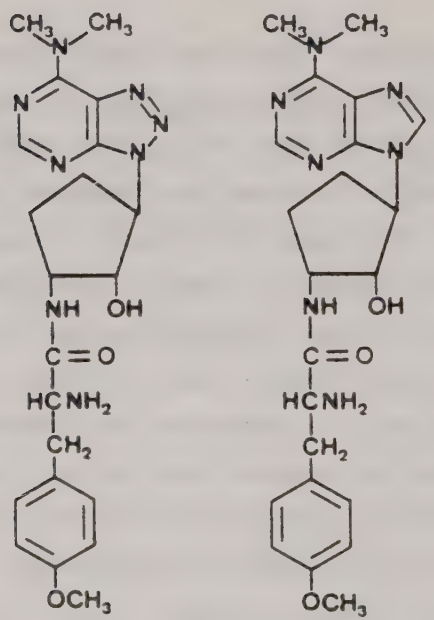
En outre, la puromycine possède des propriétés antitumorales. Toutefois, l'utilisation de cet antibiotique en chimiothérapie chez l'animal ou chez l'homme s'est avérée problématique en raison, notamment, de sa toxicité rénale (5). Cette toxicité a été attribuée à la libération enzymatique du nucléoside 3' aminé par hydrolyse du résidu d'acide aminé (o-méthyl Tyr). Le nucléoside : diméthylamino -6-[désoxy-3' amino-3'-β-D-ribofurannosyl]-9-purine, ainsi libéré, pouvant ensuite être converti en dérivé monodéméthylé puis en nucléotide 5' phosphate, ce dernier étant responsable de la toxicité (6).



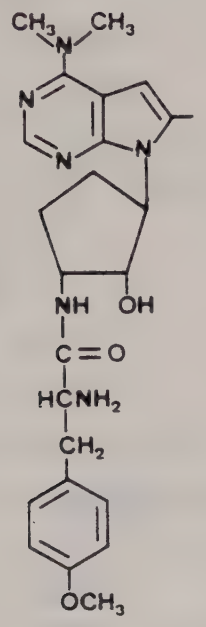
métabolite toxique de la puromycine

A partir de ces données, Vince et coll. aux USA ont synthétisé un certain nombre d'analogues de puromycine pour tenter d'obtenir une molécule qui conserverait les propriétés biologiques et biochimiques de la puromycine et serait moins toxique.

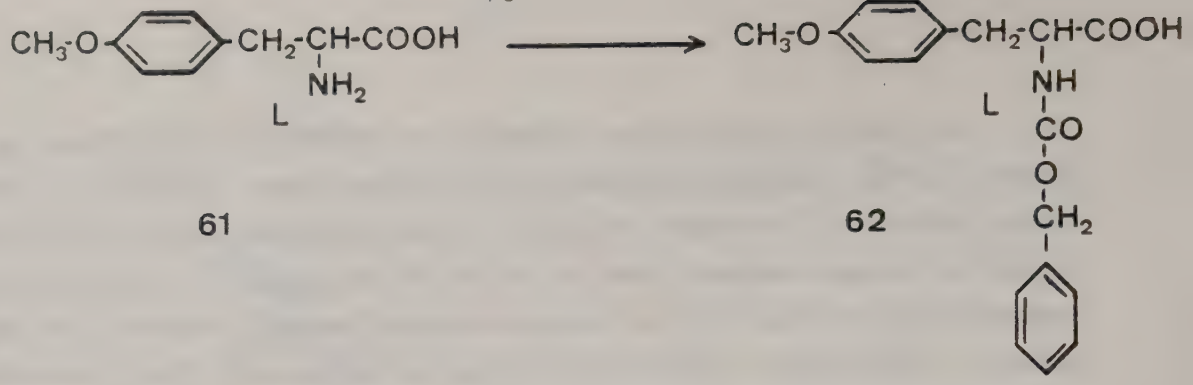
Cette recherche a permis de démontrer que l'oxygène furannosique d'une part, et la fonction alcool primaire d'autre part ne sont pas essentiels à l'activité biologique puisque les deux analogues suivants présentent des activités biologiques comparables à celles de la puromycine elle-même (7-10).



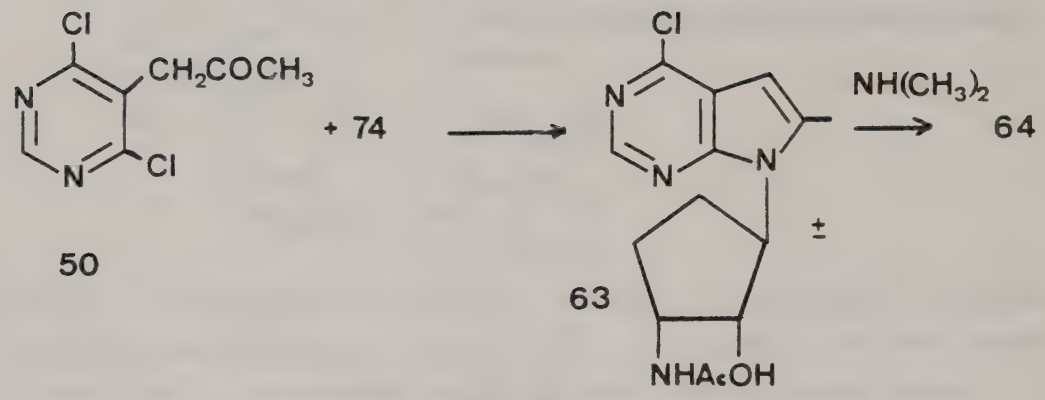
Le dérivé carbocyclique analogue de puromycine, comportant un noyau triazolo [4,5-d] pyrimidine montre que l'on peut aussi modifier la base sans perdre d'activité. L'avantage potentiel de tels analogues est évident puisque le métabolite toxique mentionné dans le cas de la puromycine, ne peut pas se former. L'ensemble de ces données de la littérature m'a ainsi amené à essayer de synthétiser un analogue carbocyclique de puromycine comportant une pyrrolo [2,3-d] pyrimidine (= 7-déaza-purine) de structure suivante :



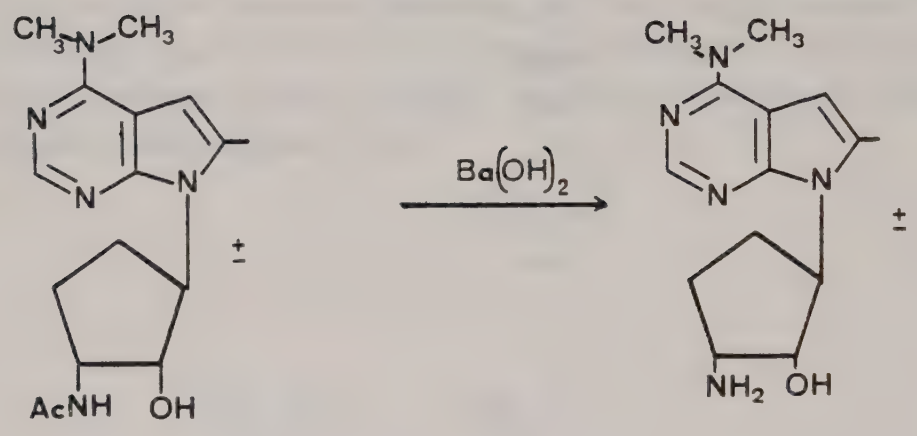
La stratégie de synthèse de cette molécule est résumée sur les schémas I et II. La condensation de l'acide aminé N-benzyloxycarbonyl-L-O-methyl tyrosine **62** sur le nucléoside aminé **65** (±) conduit à un mélange de deux diastéréoisomères **66a** et **66b** que nous avons essayé de séparer par chromatographie.



61 62



50 63 64



64 65

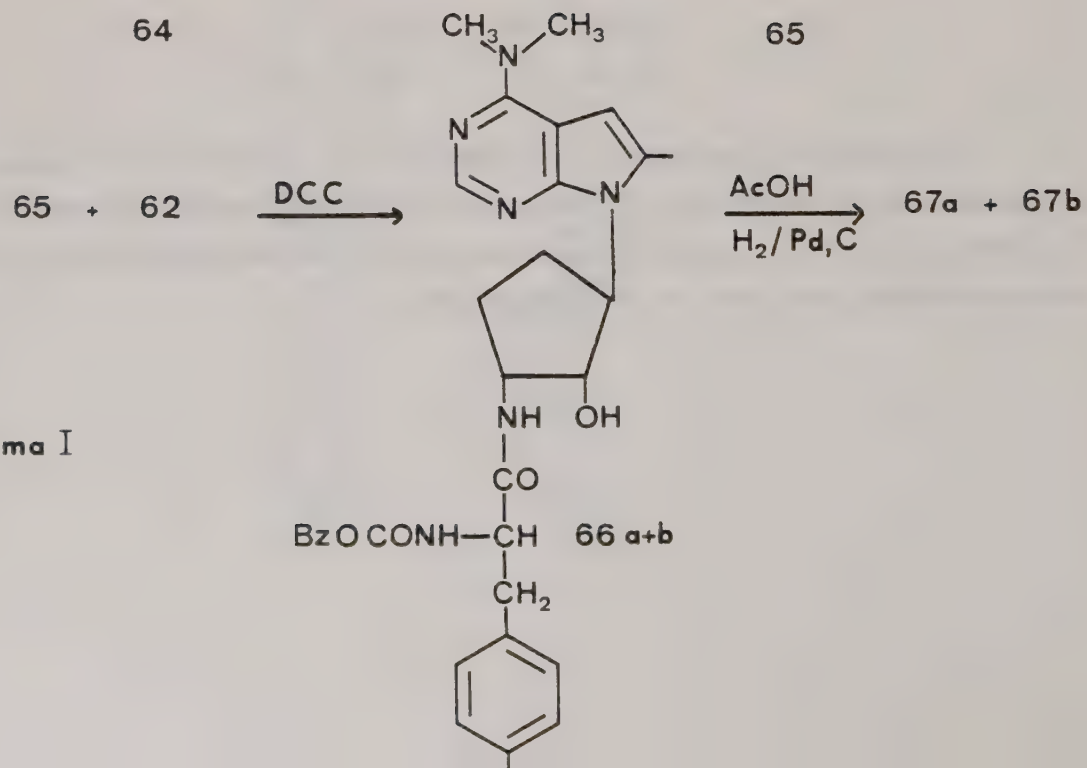


schéma I

La synthèse de l'intermédiaire cyclopentanique, nécessaire pour accéder au nucléoside carbocyclique **63**, est résumée sur le schéma II :

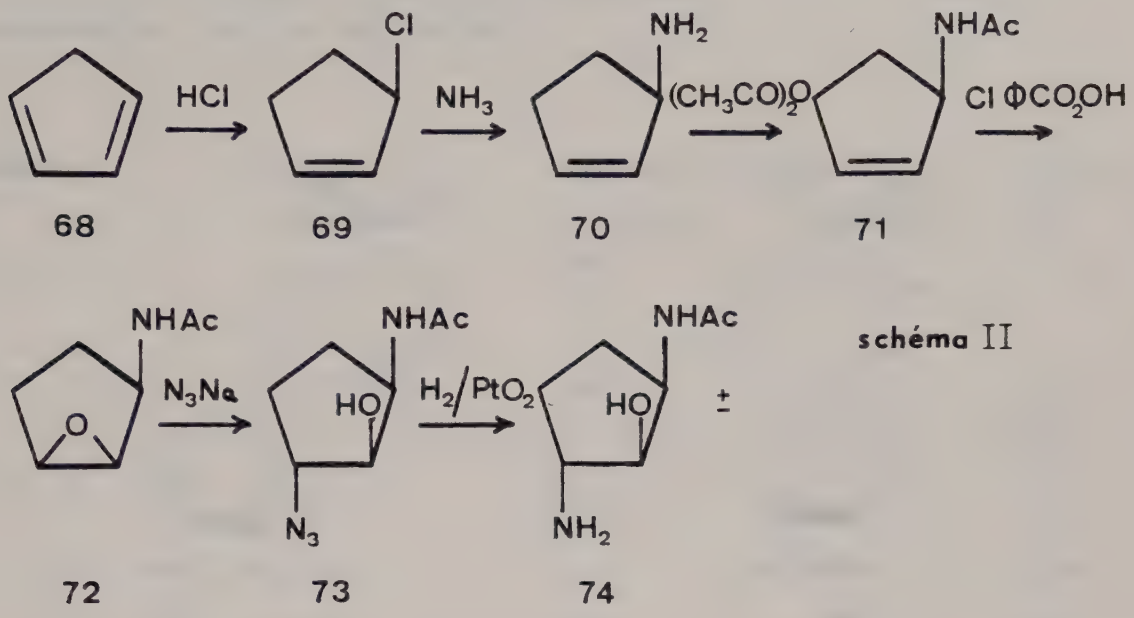


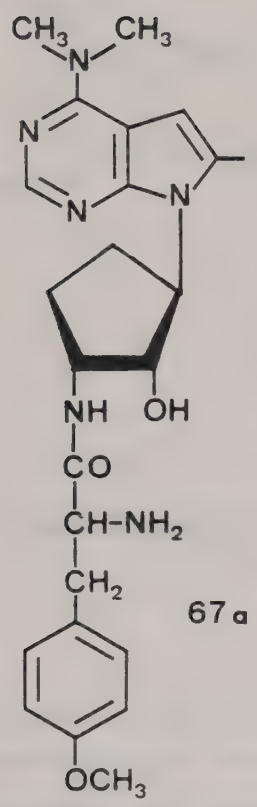
schéma II

Cette synthèse a été mise au point par Vince et Daluge en 1974 (9) et a été reproduite ici en partant du cyclopentadiène **68**.

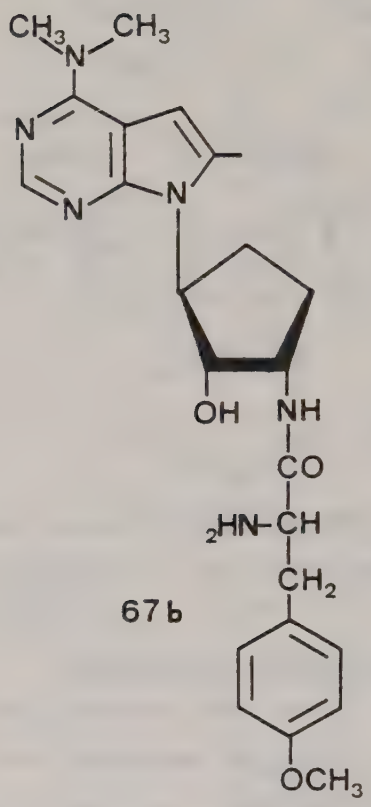
Remarques sur l'ouverture de l'époxide

En ce qui concerne l'ouverture de l'époxyde **72** par l'azide de sodium, j'ai pu obtenir l'azide **73** avec un rendement de 90 %, ce qui montre la grande sélectivité de cette ouverture. En fait, il est bien connu que la présence d'un groupement amide allylique favorise l'attaque de l'ion azide sur la position la plus éloignée du groupement amide (11) du côté le moins encombré.

Mais c'est seulement après déprotection de l'acide aminé (palladium sur charbon, H_2/AcOH) que l'on obtient un mélange de deux produits (dans les proportions 50:50) séparables sur couche mince de silice avec $CHCl_3$-EtOH 8-2 (v/v) comme éluant. Une chromatographie préparative sur colonne de silice fine (Kieselgel 60 Merck 230-400 Mesh) sous faible pression (3 à 4 bars) permet effectivement de séparer deux produits auxquels nous avons attribué les structures **67a** et **67b** représentées sur le schéma suivant.



67a



67b

Spectre de masse

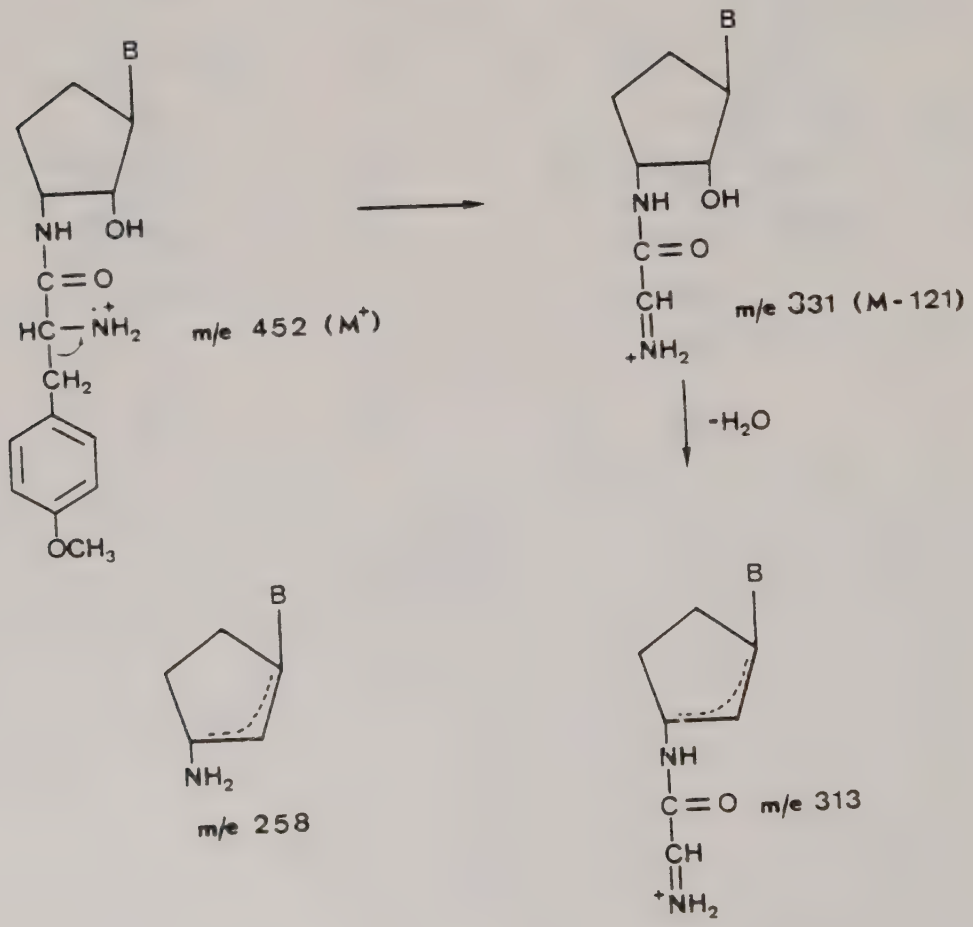
Les spectres de masse des deux diastéréoisomères par ionisation chimique (IC) dans l'ammoniac sont identiques (voir Tableau I).

ions observés m/e	fragment correspondant	abondance relative (%) (isomère I) 67a	(isomère II) 67b	rapport I/II
147	B + H - NCH_3	19,8	7,8	2,53
175	B	6	2,9	2,06
176	B + H	96,8	45,8	2,11
177	B + 2H	46,8	24,7	1,89
203	B + 28	6,8	3,1	2,19
241	-	2,4	1	2,40
258	-	4,5	1,6	2,81
276	S	4,3	1,3	3,30
313	M - 121 - 18	10,3	3,8	2,71
331	M - 121	5,1	3	1,70
435	MH^+ - 18	16	10,3	1,55
452	M^+	8,9	5,9	1,50
453	MH^+	100	100	1

TABLEAU I

Comme on peut le voir sur le Tableau I, les fragmentations sont identiques. Le spectre de masse obtenu dans le cas d'analogues carbocycliques de puromycine comportant une purine, montrait un pic moléculaire très peu intense et, comme dans le cas de la puromycine, la fragmentation principale résultait de coupures dans la partie acide aminé (8). Ici, le pic moléculaire augmenté d'une unité est le pic de base (100 %) (MH^+), ce qui est normal en ionisation chimique. La fragmentation principale ne correspond pas à une coupure dans la partie acide aminé, mais à la coupure entre la base et la partie cyclopentane. On peut remarquer toutefois que cette coupure entre la base et le sucre (qui aboutit aux ions B+H et B+2H) est très souvent la fragmentation principale dans les nucléosides (12).

Les autres coupures caractéristiques sont indiquées ci-dessous et avaient déjà été observées dans le cas d'un analogue carbocyclique purique de puromycine (8). La coupure de la base avec ionisation du sucre (S) est peu intense dans les 2 cas. Un autre ion caractéristique est l'ion moléculaire ayant perdu une molécule d'eau (MH^+ - 18). L'ion m/e 258 est également observé mais il est très faible. Enfin, deux autres pics sont observés à m/e 203 et m/e 223. L'ion m/e 203 (B + 28) correspond à l'ion (B + 30) observé dans les nucléosides qui comportent un ribose (B + 30 ⇔ B - $\overset{+}{C}$H - OH).



Résultats biologiques préliminaires

Les produits **67a** et **67b** ont été testés[(a)] sur quelques souches bactériennes. Aucune activité antibactérienne n'a été mise en évidence jusqu'à présent. Toutefois, la puromycine elle-même (Sigma) ne s'est montrée active que sur Staphylococcus Aureus.

	67a (22,6 µg)*	**67b** (45 µg)*	**puromycine** (29 µg)*
Bacillus Subtilis (ATCC 6633)	-	-	-
Proteus Vulgaris (ATC 13315)	-	-	-
Staphylococcus Aureus (ATC 6538P)	-	-	+ + +
Escherichia coli (ATC 10536)	-	-	+
Candida Albicans	-	-	-

* Quantité de produit déposée par boite de Petri

La cytotoxicité de ces produits sur des cellules de la leucémie de Friend (745) en culture a également été examinée[(b)].

Le produit **67a** à la concentration de 10^{-4} M inhibe la croissance cellulaire (71,33 %) d'inhibition). Le produit **67b** à la même concentration (10^{-4} M), est aussi cytotoxique (48,25 % d'inhibition).

(a) Ces tests ont été effectués par G. Farrugia (Service de Microbiologie ICSN-CNRS à Gif-sur- Yvette) que je remercie.

(b) Ces expériences ont été réalisées par M. Charon, sous la responsabilité de F. Wendling et P. Tambourin (Unité 22 de l'INSERM, Institut Curie, Orsay). Le pourcentage d'inhibition a été déterminé par comptage des cellules 24 heures après la mise en contact avec le produit.

PARTIE EXPERIMENTALE

N-benzyloxycarbonyl-0-methyl-L-tyrosine 62

L'acide aminé protégé **62** a été obtenu à partir de la 0-méthyl-L-tyrosine (Aldrich) et du chlorure de benzyloxycarbonyl selon Baker et coll. (13) (le chlorure de benzyloxycarbonyl a lui-même été préparé à partir de phosgène et d'alcool benzylique selon la littérature (14), rendement : 91 % ; F : 110-112°C (litt. F : 110°C (13)).
RMN ^1H dans DMSO d_6 : 7,54 (NH, d, J_{NH-CH} = 8,1 Hz) ; 7,34 (C_6H_5,s) ; 7,20 et 6,86 (C_6H_4 tyr, 2d, J = 9 Hz) ; 5,01 (OCH_2, s) ; 4,18 (CH, sextuplet) ; 3,76 (OCH_3, s) ; 3,16-2,52 (CH_2, m).

(±) [β-(acétamido-3α-hydroxy-2α) cyclopentyl]-7-dimethylamino-4-méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine 64

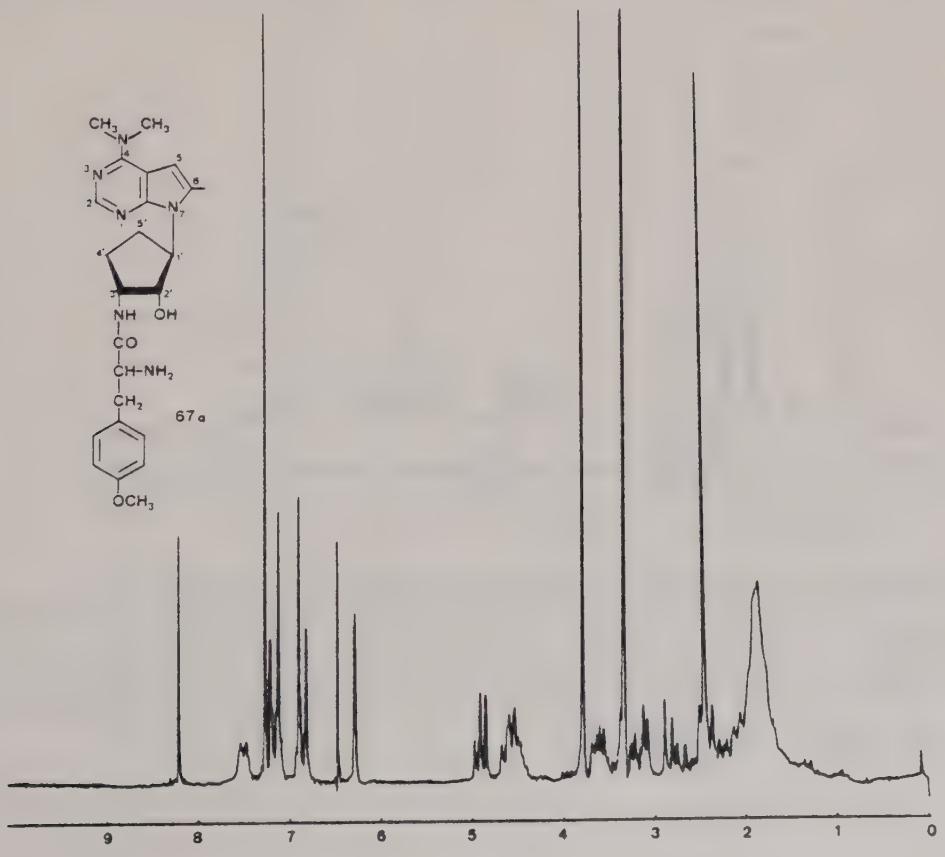
On chauffe à reflux une solution de 2 g (10 mmoles) de la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine (**50**) (15) (éthanol/eau 50 % ; 40 ml) et de 1,58 g (10 mmoles) d'acétamido-2 amino-5 cyclopentanol **74** en présence de tributylamine. Après 15 heures, une chromatographie sur couche mince (CCM) de silice indique que la réaction est complète (Rf = 0,32 ; AcOEt-EtOH 9/1).

L'intermédiaire chloré **63**, après évaporation à sec du mélange réactionnel, cristallise dans l'éthanol. Ce dernier est immédiatement chauffé dans la diméthylamine éthanolique à 33 % (Fluka) dans un tube scellé pendant 15 h à 100°C. Après évaporation de l'alcool, le produit attendu **64**, cristallise dans l'acétate d'éthyle ; Rf : 0,16 en CCM (voir plus haut). Le rendement global est de 72 % ; F : 202-203°C ; analyse élémentaire: calculé : C, 60,55 ; H, 7,30 ; N, 22,07. Trouvé : C, 60,52 ; H, 7,30 ; N, 22,04.
RMN ^1H $CDCl_3$: 8,21 (H_2, s) ; 6,30 (H_5, q) ; 6,10 (NH, d) ; 4,87 ($H_{1'}$, q) ; 4,58 ($H_{1'}$, $H_{2'}$, m) ; 3,34 ($N(CH_3)_2$, s) ; 2,43 (CH_3, d, J = 1 Hz) ; 2,05 (CH_3-CO ; s) ; 2,35-1,74 (CH_2 4' et CH_2 5', m).

(±)-diméthylamino-4- [hydroxy-2α-(p-méthoxy-phényl-L-alanylamino)-3α-cyclopentyl-1β] -7 methyl-6-pyrrolo [2,3-d] pyrimidine 67

Une solution du dérivé N acétylé **64** (300 mg, 0,94 mmoles) dans $Ba(OH)_2$ 0,5 N (30 ml) est chauffée à reflux la nuit, sous atmosphère d'azote. On ajoute ensuite 30 ml d'éthanol puis de la carboglace en excès. Le précipité de Ba CO_3 est filtré sur célite. Après évaporation sous vide partiel, on obtient une huile incolore qui est passée sur une résine Dowex IRA 400 (OH^-) préparée dans le méthanol. Un lavage de la résine au méthanol permet d'obtenir 250 mg de l'intermédiaire déacétylé **65**. Cette amine libre est immédiatement dissoute dans 15 ml de DMF sec en présence de 329 mg (1 mmole) de N-Cbz-0-méthyl-L-tyrosine (**62**) et 115 mg (1 mmole) de N-hydroxysuccinimide (Aldrich). A cette solution, on ajoute à froid (0°C) 206 mg (1 mmole) de

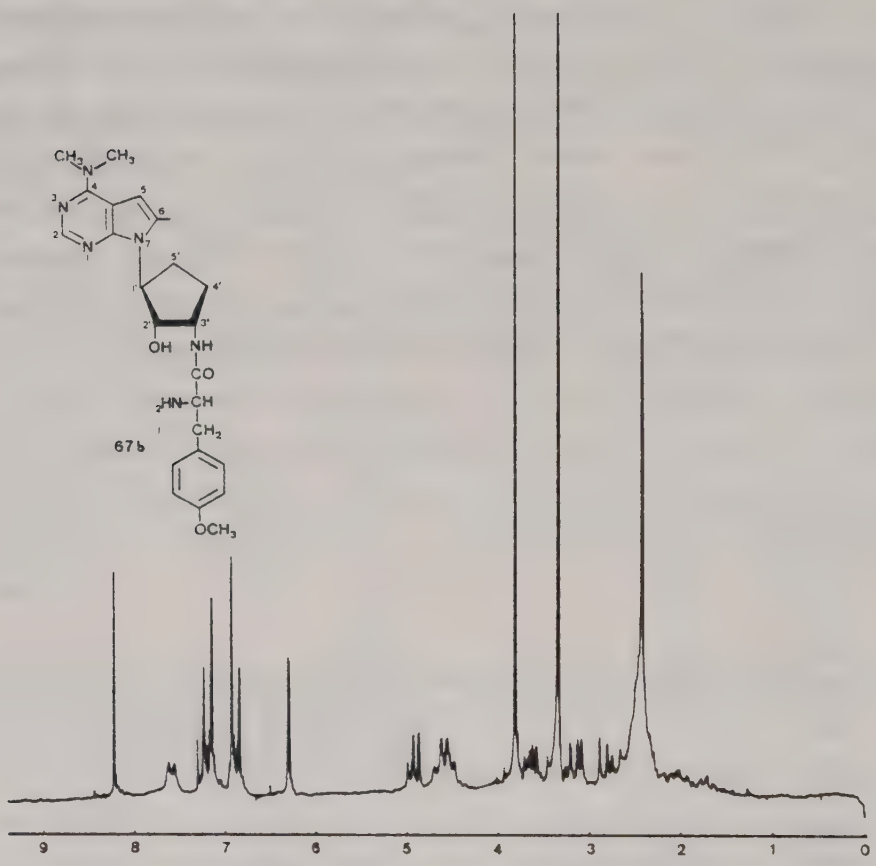
dicyclohexylcarbodiimide (Merck). Le mélange réactionnel protégé de l'humidité par une garde à $CaCl_2$ est ensuite agité pendant 48 heures à température ambiante. Le précipité blanc de dicyclohexylurée est alors filtré et lavé à l'acétate d'éthyle (AcOEt). Après évaporation des solvants, on redissout l'huile dans 100 ml d'AcOEt et on filtre à nouveau l'insoluble (dicyclohexylurée vérifiée par RMN). On effectue ensuite un lavage à l'eau (20 ml), au bicarbonate de sodium (3 x 20 ml) puis à l'eau (3 x 20 ml). La phase organique est alors séchée sur $CaSO_4$ et évaporée sous vide pour donner le mélange des diastéréoisomères **66** sous forme d'huile incolore qui n'ont pas pu être séparés en CCM (une seule tache sur silice dans plusieurs systèmes de solvants) Rf : 0,56 ($CHCl_3$-EtOH 9-1 v:v). Le mélange des diastéréo-isomères **66** (530 mg, 0,90 mmole), dissous dans 40 ml d'acide acétique (AcOH), est alors agité en présence de charbon palladié à 10 % sous atmosphère d'hydrogène pendant une heure. Le mélange est filtré sur célite et la célite lavée avec 40 ml d'AcOH. L'AcOH est distillé sous vide puis le résidu (évaporé plusieurs fois en présence d'éthanol) est déposé au sommet d'une colonne Dowex IRA 400 (OH^-) préparée dans le méthanol. L'éluat basique contient deux produits majoritaires visibles en CCM de silice sous UV : Rf : 0,11 et Rf : 0,24 ($CHCl_3$-EtOH 9-1 v:v), 223 mg (55 %). Ces deux produits sont les deux diastéréoisomères attendus **67** et ont été séparés sur colonne de silice (230-400 mesh Merck Kieselgel 60) (90 x 1 cm) éluée avec $CHCl_3$-EtOH 9-1 sous pression de 3 à 4 bars. Le produit de Rf : 0,11 (arbitrairement **67a**) cristallise dans l'éthanol ; F : 204°C $[\alpha]_D^{17°}$ = -66° (C : 0,3, $CHCl_3$) ; UV max : ε_{283} = 25 300 et ε_{220} = 43 700. Analyse calculée pour $C_{24}H_{32}N_6O_3$, 1/2 CH_3CH_2OH : C, 63,15 ; H, 7,36 ; N, 17,68 ; trouvé : C, 62,98 ; H, 7,33 ; N, 17,74.



RMN du ^1H dans $CDCl_3$ 8,20 (H_2,s) ; 7,5 (NH,d, J = 6,5 Hz) ; 7,15 (H arom. ortho, d, J = 8,5 Hz) ; 6,85 (H arom. méta, d, J = 8,6 Hz) ; 6,27 (H_5, qnr[a]) ; 4,90 ($H_{1''}$, m) ; 4,58 ($H_{2'}$ et $H_{3''}$, m) ; 3,78 ((OCH_3, s) ; 3,62 (CH, m) ; 3,32 ($N(CH_3)_2$, s) ; 3,16 et 2,76 (CH_2, m) ; 2,42 (CH_3, dnr) ; 2,11 (NH_2, m) ; 2,46 - 1 ($H_{4'}$ et $H_{5''}$, m.n.r.).

(a) nr : non résolu

Le produit de Rf = 0,24 (arbitrairement 67b) n'a pas pu être obtenu à l'état cristallisé $[\alpha]_{589}^{17°}$ = -1,6°C (C = 0,3 ; $CHCl_3$).
UV max ε_{285} = 24 800 et ε_{220} = 42 400.
Analyse calculée pour $C_{24}H_{32}N_6O_3$: C, 63,69 ; H, 7,13 ; N, 18,57. Trouvé : C, 63,42 ; H, 6,85 ; N, 18,24.

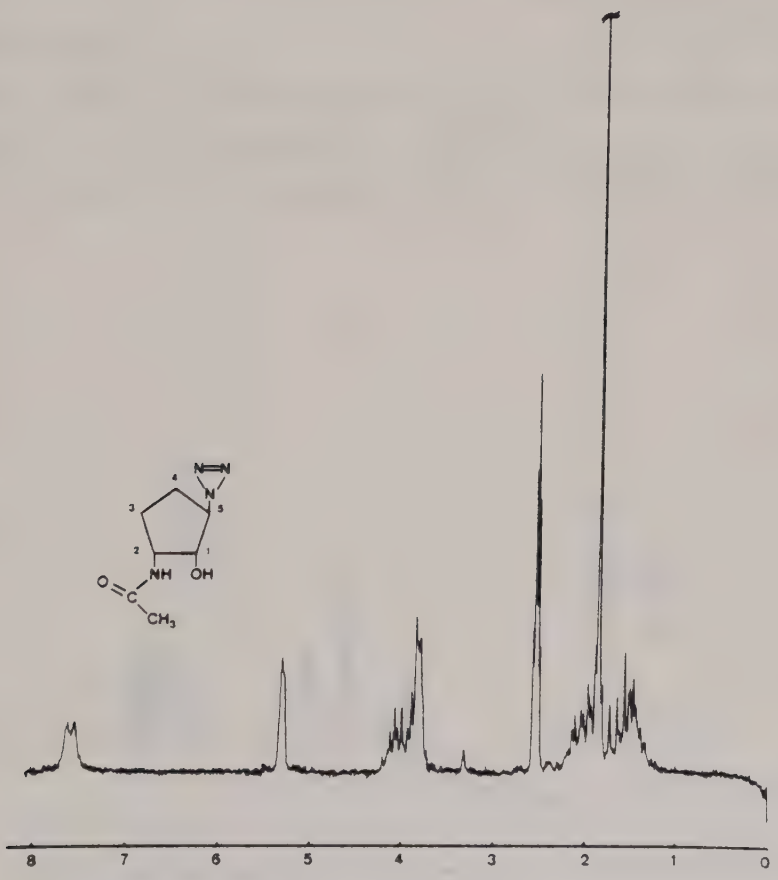


RMN du ^1H dans $CDCl_3$ 8,19 (H_2, s) ; 7,56 (NH, d, J = 6,6 Hz) ; 7,16 (H arom. ortho, d, J = 8,8 Hz) ; 6,86 (H arom. méta, d, J = 9 Hz) ; 6,27 (H_5, q, J = 1 Hz) ; 4,91 ($H_{1''}$, m) ; 4,57 ($H_{2'}$ et $H_{3''}$, m) ; 3,79 ((OCH_3, s) ; 3,63 (CH, m) ; 3,32 ($N(CH_3)_2$, s) ; 3,16 et 2,76 (CH_2, m) ; 2,40 (CH_3, dnr) ; 2,41 (NH_2, m) ; 2,30-1,1 ($H_{4'}$ et $H_{5''}$, m).

(±)Acétamido-2α-azido-5β-cyclopentanol-1α **73**

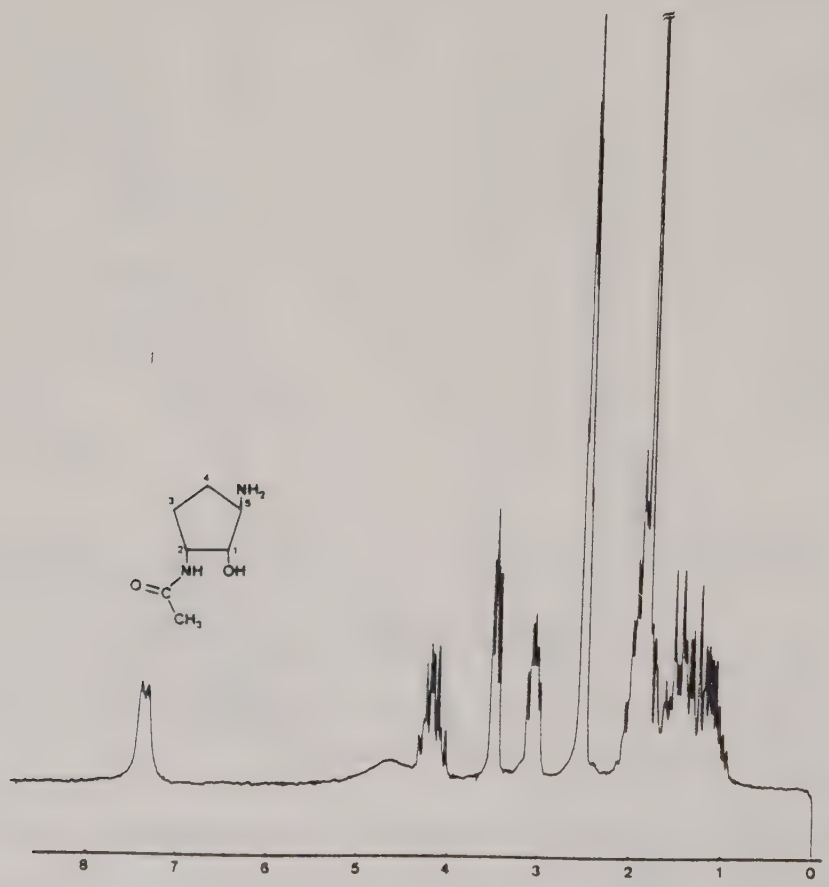
Un mélange de l'époxide **72** (9) (10 g ; 70,9 mmoles) de NaN_3 (18,43 g ; 283,6 mmoles), de NH_4Cl (4 g, 75 mmoles) dans 200 ml d'éthermonométhylique de l'éthylène glycol et 29 ml d'eau est agité pendant 16 heures à 80°C. La solution est alors évaporée sous pression réduite et le résidu dissous dans 50 ml d'eau saturée en NaCl. Cette solution est extraite avec $CHCl_3$ (4 x 50 ml). La phase organique est séchée ($CaSO_4$) et évaporée. Le produit pur est obtenu par cristallisation dans le benzène. Rendement 90 % ; F : 77-80° ; Analyse calculée pour $C_7H_{12}N_4O_2$: C, 45,64 ; H, 6,57 ; N, 30,42 ; trouvée ; C, 45,56 ; H, 6,51 ; N, 30,28.

RMN ^1H, $DMSOd_6$ 7,60 (NH,d,J_{NH-H2} = 7,5 Hz) ; 5,30 (OH,d,J_{OH-H1} = 2,3 Hz) ; 4,21-3,80 ($H_{1,}H_{2,}H_{5}$,m) ; 2,14-1,26 (2xCH_2,m) ; 1,85 (CH_3,s).



(±) Acétamido-2α-amino-5β-cyclopentanol-1α **74**

L'azide **73** (9) (8,6 g, 46,7 mmoles) en solution dans 100 ml d'éthanol absolu a été agité, à température ambiante, dans un autoclave, en présence de 100 mg d'oxyde de platine sous 4 atmosphères d'hydrogène pendant 15 heures. Pendant les 5 premières heures de la réaction, l'hydrogène et l'azote formé sont évacués puis remplacés par de l'hydrogène (4 fois). Le mélange résultant est dilué avec de l'éthanol bouillant (100 ml) pour dissoudre le précipité blanc du produit attendu (**74**). Le catalyseur est filtré puis lavé à l'éthanol (100 ml). Les filtrats sont alors réunis et évaporés. L'amine **74** recristallise dans l'éthanol froid. Rendement : 92 % ; F : 168°C ; Analyse calculée pour $C_7H_{14}N_2O_2$: C, 53,14 ; H, 8,92 ; N, 17,71 ; trouvée : C, 52,86 ; H, 8,99 ; N, 17,54.
RMN ^1H, DMSO d_6 7,36 (NH, d, J_{NH-H2} = 7,9 Hz) ; 4,6 (OH, NH_2) ; 4,19 (H_2, m, $J_{H2-H3a} = J_{H2-H3b}$ = 7,9 Hz) ; 3,50 (H_1, m, J_{H1-H2} = 5 Hz ; J_{H1-H5} = 3,2 Hz) ; 3,07 (H_5, m, J_{H5-H4a} = 6,3 Hz ; J_{H5-H4b} = 4,7 Hz) ; 1,85 (CH_3, s) ; 1,9 (H_{5b} et H_6,m) ; 1,48 (H_{4a},m) ; 1,10 (H_{5a},m).



BIBLIOGRAPHIE

1. Porter, J.N., Hewitt, R.I., Hessetine, C.W., Krupka, G., Lowery, J.A., Wallace, W.S., Bohonos, N. et Williams, J.H. Antibiot. Chemotherapy 2, 409 (1952).
2. Suhadolnik, R.J. Nucleoside Antibiotics, Wiley, New York, 1, (1970).
3. Suhadolnik, R.J. Nucleosides as Biological Probes, Wiley, New York, 96 (1979).
4. Nicholson, A.W., Hall, C.C., Strychaz, W.A. and Cooperman, B.S. Biochemistry 21, 3797 (1982).
5. Nathans, D. in "Antibiotics I, Mechanism of Action", Gottlieb, G. and Show, P.D., Eds., Springer-Verlag, New York, p. 259-277 (1967).
6. Kmetec, E. and Tispack, A. Biochem. Pharmacol. 19, 1493 (1970).
7. Vince, R., Daluge, S. and Palm, M. Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 866 (1972).
8. Daluge, S. and Vince, R. J. Med. Chem. 15, 171 (1972).
9. Vince, R. and Daluge, S. J. Med. Chem. 17, 578 (1974).
10. Duquette, P.H., Ritter, C.L. and Vince, R. Biochemistry 13, 4855 (1974).
11. Parker, R.E. and Isaac, N.S. Chem. Rev. 59, 737 (1959).
12. Shaw, S.J., Desiderio, D.M., Tsuboyama, K. and Mc Closkey, J.A. J. Am. Chem. Soc. 92, 2510 (1970).
13. Baker, B.R., Joseph, J.P. and Williams, J.H. J. Am. Chem. Soc. 77, 1 (1955).
14. Katchalski, E. Methods in Enzymology 3, 540 (1957).
15. Bisagni, E., Marquet, J.P., André-Louisfert, J. Bull. Soc. Chim. France, 4338 (1969).

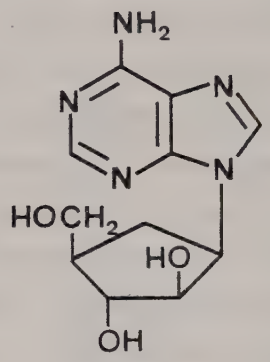
CHAPITRE VI

ETUDE DE NOUVEAUX PSEUDONUCLEOSIDES

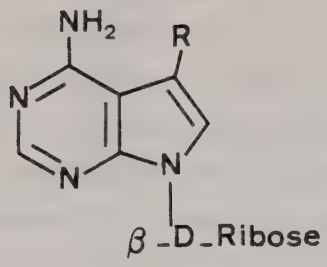
A) SYNTHESE DE PSEUDONUCLEOSIDES DERIVES DES PYRROLO [2,3-d] PYRIMIDINES*

Divers analogues de l'adénosine,en particulier les composés **1a**, **1b** et **2** présentent des propriétés antivirales notables (2,3,4). Par rapport à l'adénosine, ces composés comportent à la place du ribose, un substituant acyclique (1) ou carbocyclique (2). Afin de voir si des modifications du même genre peuvent faire apparaître une activité antivirale dans la série des pyrrolo [2,3-d] pyrimidines dont dérivent plusieurs antibiotiques naturels (tubercidine 3, sangivamycine 4, toyocamycine 5) qui présentent eux-mêmes une activité antitumorale (5), nous avons entrepris de préparer et d'étudier divers analogues dérivés de cette série. Dans le présent mémoire, nous décrivons les premiers résultats enregistrés à ce propos.

1a : $R_1 = NH_2$; $R_2 = H$; $R_3 = CHOHCH_2OH$
1b : $R_1 = OH$; $R_2 = NH_2$; $R_3 = OCH_2CH_2OH$

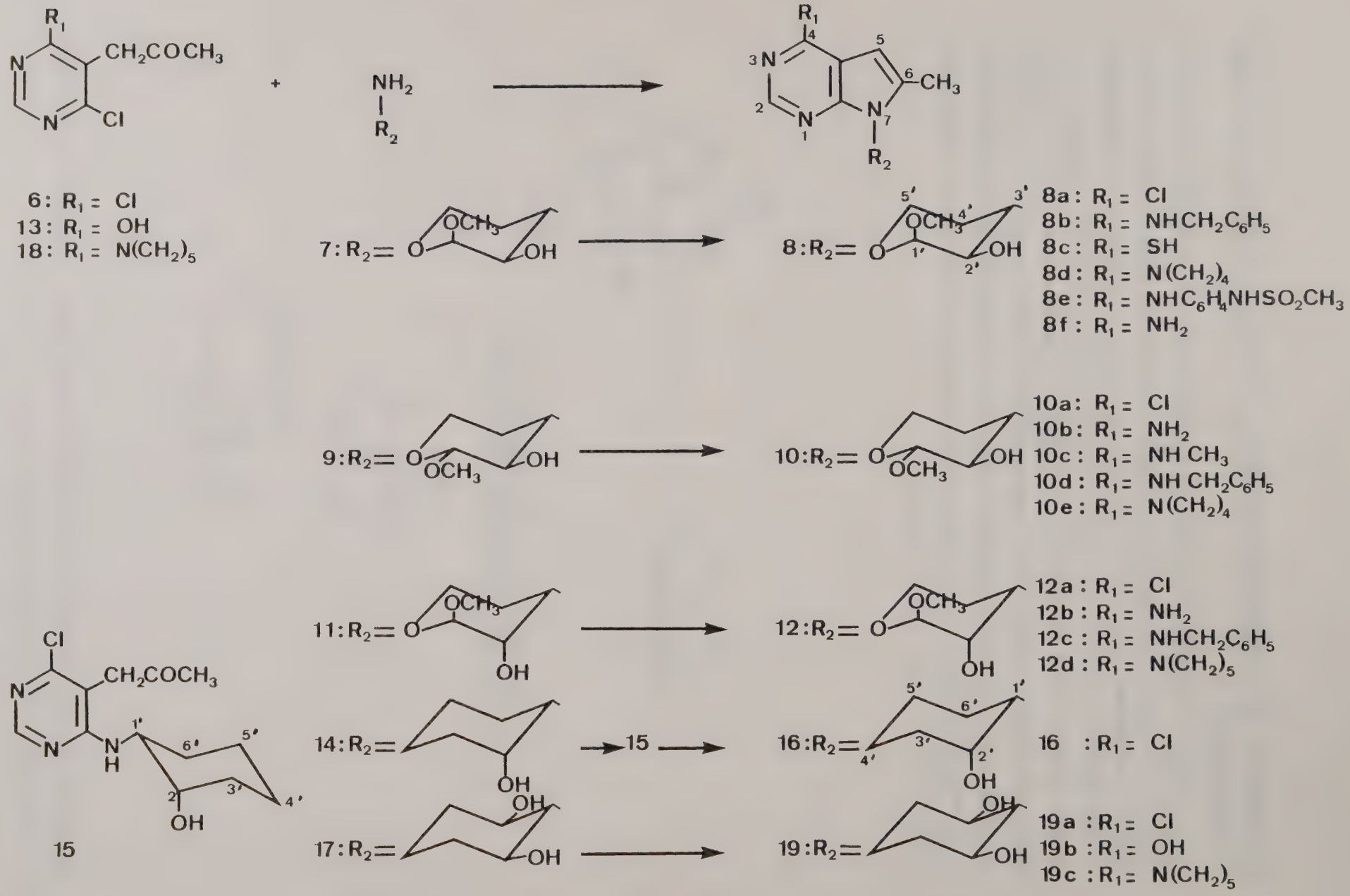


2



3 : R = H
4 : R = $CONH_2$
5 : R = CN

* Travail réalisé en collaboration avec Monsieur Daniel Anker, Laboratoire de Monsieur le Professeur Henri Pacheco, I.N.S.A., Villeurbanne


6: R1 = Cl
13: R1 = OH
18: R1 = N(CH2)5
7: R2 =
8: R2 =
8a: R1 = Cl
8b: R1 = NHCH2C6H5
8c: R1 = SH
8d: R1 = N(CH2)4
8e: R1 = NHC6H4NHSO2CH3
8f: R1 = NH2
9: R2 =
10: R2 =
10a: R1 = Cl
10b: R1 = NH2
10c: R1 = NH CH3
10d: R1 = NH CH2C6H5
10e: R1 = N(CH2)4
11: R2 =
12: R2 =
12a: R1 = Cl
12b: R1 = NH2
12c: R1 = NHCH2C6H5
12d: R1 = N(CH2)5
14: R2 =
15
16: R2 =
16 : R1 = Cl
17: R2 =
19: R2 =
19a: R1 = Cl
19b: R1 = OH
19c: R1 = N(CH2)5
15

Suivant une méthode décrite en 1969, la condensation de la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine avec les amines primaires permet généralement d'accéder à des chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidines diversement substituées sur leur sommet 7 (6). Cette méthode a été utilisée pour préparer des dérivés assez variés de cette série hétérocyclique apparentée aux purines (7,8) mais du fait de l'instabilité de la liaison C-N des sucres aminés sur leur position 1 dans les conditions de la réaction, elle n'a jamais été mise en oeuvre pour former des analogues de nucléosides. Disposant à présent d'une voie d'accès à divers amino py rannoses (9) qui s'apparentent à des amino sucres, nous avons utilisé ces derniers ainsi qu'une dihydroxycyclohexylamine pour préparer des pseudonucléosides tout à fait nouveaux. Ainsi, la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine **6** réagit avec l'amino-3 didésoxy-3,4 β -D,L-thréo-pentopyrannoside de méthyle **7** dans l'eau bouillante pour donner la chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine correspondante **8a.** La benzylamine, la thiourée, la pyrrolidine et la méthyl-sulfonamide-4 aniline substituent ensuite normalement l'atome de chlore du composé **8a** pour donner respectivement les dérivés **8b** à **8e** attendus et l'amino-4 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **8f** est obtenue par hydrogénation catalytique du dérivé benzylé **8b.** D'une manière identique, l'amino-3 didésoxy-3,4 α-D,L-thréopentopyrannoside de méthyle **9** donne accès au composé chloré **10a,** que nous avons substitué par l'ammoniaque, la méthylamine, la benzylamine et la pyrrolidine pour former les pyrrolo [2,3-d] pyrimidines **10b** à **10e** (Schéma I). Nous pensions donc que l'amino-3 didésoxy-3,4β-D,L érythropentopyrannoside de méthyle **11,** donnerait la pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **12a** (R_1 = Cl), mais après 4 h de reflux dans le mélange éthanol-eau, on récupère 50 % de la dichloro pyrimidine **6** et, dans l'eau bouillante le seul composé isolé après 24 h de reflux correspond à la dihydro-3,4-oxo-4 acétonyl-5 chloro-6 pyrimidine **13** (31,4 %) résultant de l'hydrolyse partielle de **6.** Alors que dans les cas de **7** et **9,** l'hydroxyle en 2 présente une stéréochimie trans par rapport au groupement amino-3, le composé **11** est sous la forme cis. Cette particularité structurale pouvant éventuellement être en relation avec l'échec enregistré dans le cas du composé **11,** nous avons essayé de condenser l'hydroxy-2 cyclohexylamine **14** (10,11) probablement plus stable que son analogue hétérocyclique **11,** sur la dichloropyrimidine **6.** Dans les conditions où **7** et **9** conduisent directement aux pyrrolo [2,3-d] pyrimidines attendues **8a** et **10a, 14** fournit la pyrimidine substituée intermédiaire **15** comme dans le cas de certaines amines très encombrées (8) et la pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **16** se forme seulement en chauffant **15** dans l'éther monométhylique de l'éthylène glycol bouillant.

L'hydroxyle en position cis défavorise donc la cyclisation et, puisque la dichloro pyrimidine **6** reste inchangée lorsqu'elle est traitée par l'eau bouillante, l'échec enregistré avec l'amine **11** dans l'eau doit être dû à l'instabilité du produit intermédiaire qui s'hydrolyse en **13** au lieu de se cycliser pour conduire à **12.** Plusieurs autres résultats négatifs enregistrés avec la glucosamine et la galactosamine sont d'ailleurs à rapprocher de l'échec précédent qui ne paraît pas être une exception. Quelle que soit

	OH	OCH_3	H1'	H2'	H3'	H4'a	H4'e	H5'a	H5'e	H2	H5	CH_3
8a	4,89 (d) JOH-H2' = 7,3	3,29 (s)	4,59	à (m)	4,74	2,97 (m)	1,86 (2m)	3,59	à 3,92 (m)	8,52 (s)	6,38 (q) J_{H5-CH_3} = 1	2,49 (dnr)
10a	5,22 (d) JOH-H2' = 3,4	3,43 (s)	4,15	à (m)	4,34	2,9 (m) $J_{4'a-4'e}$ = 12,5	1,82 (2m) $J_{4'e-5'e}$ = 1,5	3,58 (td) $J_{5'a-4'a}$ = 12 $J_{5'a-5'e}$ = 11,7	3,99 (dd) $J_{5'e-4'a}$ = 5 $J_{5'e-4'e}$ = 1,5	8,52 (s)	6,38 (q) J_{H5-CH_3} = 1	2,49 (dnr)
12a	5,40 (d) JOH-H2' = 5,5	3,35 (s)	4,59 (d) $J_{H1'-H2'}$ = 1,6	3,66 (m)	5,17 (2t) $J_{3'a-4'a}$ = 13,1 $J_{3'a-4'e}$ = 3,5	3,11 (m) $J_{4'a-5'e}$ = 3	1,71 (2m) $J_{4'e-5'e}$ = 1,8	3,79		8,52 (s)	6,40 (q) J_{H5-CH_3} = 1	2,61 (d)

Tableau I. Rmn ^1H à 100 MHz. Déplacements chimiques en ppm des différents protons indiqués pour les produits 8a, 10a et 12a. Les valeurs des constantes de couplage J sont exprimées en Hertz.

l'explication définitive de ces résultats, nous avons réussi à préparer le pseudo nucléoside **12a** en effectuant la réaction dans l'éther monométhylique de l'éthylène glycol. Dans ce solvant, la réaction **6** + **11** donne **12a** est complète après deux heures à reflux. Si on prolonge la réaction, des produits de dégradation apparaissent. Enfin, la différence de comportement entre les amino-alcool cycliques cis et les dérivés trans correspondants est bien confirmée avec la trans-trans 2,6-dihydroxy cyclohexylamine **17**. En effet, celle-ci réagit aussi bien avec la dichloro pyrimidine **6** qu'avec ses dérivés hydroxylé **13** ou aminé **18**, en donnant directement les pyrrolo [2,3-d] pyrimidines **19a** à **19c** attendues, issues de la substitution-cyclisation directe

Compte tenu du mode univoque de préparation des produits synthétisés dans ce travail, leur structure ne présentait aucune ambiguité à priori. Cependant, nous avons vérifié que leurs spectres de masse présentent bien les pics caractéristiques attendus (pic moléculaire (M+) ainsi que les pics B, B+H et B+2H résultant de la coupure de la liaison base-pyrannose). Par ailleurs, l'étude rmn réalisée plus particulièrement sur les dérivés chlorés (**8a**, **10a**, **12a**, **15**, **16** et **19a**) confirme les structures attribuées.

Pour le composé **19a**, le triplet attribué au proton H1' avec une double constante de couplage de 9,6 Hz (partie expérimentale), caractérise bien une orientation équatoriale préférentielle de l'hétérocycle (12). Cette même orientation équatoriale est mise en évidence sur le deuxième dérivé cyclohexanique **16** par la constante de couplage J1'a,6'a = 12.5 Hz. Pour le dérivé **12a** (Tableau) la liaison base hétérocyclique - cycle pyrannique est encore équatoriale ; cette orientation est caractérisée par les constantes J3'a,4'a = 13,1 Hz et par la constante très faible J1',2' = 1,6 Hz qui confirme l'orientation diéquatoriale des protons correspondants. Pour le composé **8a** aucune constante de couplage caractéristique n'a pu être mesurée, cependant, la comparaison des déplacements chimiques des protons de **8a** et **12a** qui ne diffèrent que par l'orientation de l'hydroxyle en 2' met en évidence un déplacement de H3' dans **8a**, vers les champs forts conformément aux observations de la littérature (13,14) ; on observe également un déplacement dans le même sens du proton H4'a de **8a** qui ne subit plus l'effet du groupe polaire axial en 2' (15,16,17) : ces variations sont bien en accord avec une orientation équatoriale de la base hétérocyclique.

La comparaison de **8a** et **10a** met en évidence un déplacement vers les champs forts de H1', H2' et H3' dans ce dernier composé ; ce déplacement est caractéristique du passage de H1' de la position équatoriale dans **8a** à la position axiale dans **10a** (12) ; H2' est déplacé dans le même sens car il ne subit plus l'influence du méthoxyle axial en (13,14) tandis que H3' n'est plus soumis à l'effet du même méthoxyle axial en (15,16,17), ce dernier effet est également sensible au niveau de H5' puisque H5'a se trouve à champ plus fort (3,58 ppm) que H5'e (3,99 ppm) dans **10a** alors que ces deux protons n'étaient pas séparés dans **8a**. On remarque également, conformément aux

observations de Lemieux et coll. (18), que le méthoxyle équatorial dans **10a** résonne à champ plus faible que dans les isomères **8a** et **12a**.

Bien que la résolution ne soit pas toujours suffisante pour permettre la mesure de toutes les constantes de couplage caractéristiques, on peut cependant observer que la base hétérocyclique est liée équatorialement au cycle pyranne ou cyclohexane , ce qui est normal compte tenu de sa taille importante. La géométrie des différents protons déduite de la mesure des constantes de couplage, quand elle est possible, et des déplacements chimiques suggère une conformation chaise.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tous les produits décrits présentent une seule tache visible sous lumière UV après migration sur couche mince de silice dans différents systèmes de solvants. Les analyses élémentaires ont été effectuées par le service centrale de Microanalyse du CNRS à Gif-sur-Yvette. Les points de fusion ont été pris sur un banc de Köfler et ne sont pas corrigés. Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (rmn ^1H) ont été effectués sur un spectromètre à impulsions Varian XL 100 à 100 MHz. L'attribution des pics aux différents protons a été effectuée par des expériences de découplage ; s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, q = quadruplet, nr = non résolu. Les déplacements chimiques sont exprimés par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence interne. Les spectres de masse (sm) ont été obtenus sur un spectromètre MS30 AEI CRATOS double focalisation couplé avec un ordinateur de traitement des données Varian 100 MS. M^+ = ion moléculaire, B = base ; le chiffre entre parenthèses indique le pourcentage du pic de base (100 % d'intensité).

L'activité antivirale des nucléosides a été déterminée in vitro, dans les laboratoires IRS-SARBACH par Melle MEON sous la direction du Dr. YAVORDIOS, par la méthode des plages en milieu gélosé de Dulbecco (19), vis-à-vis de deux types de virus :

- un virus à ADN, le virus de la vaccine du groupe des Poxvirus,
- un virus à ARN, le virus Sindbis du groupe des Arbovirus.

Ces virus sont cultivés tous deux sur des cellules d'embryons de poulet, cellules de première explantation réalisées au laboratoire. Le test se fait en boîtes de Pétri 60 mm Falcon, les tapis cellulaires confluents sont infectés avec 50-100 unités formant plages (UFP) du virus ; après 2 heures d'incubation à 37°, un milieu gélosé est coulé sur les cellules. Les plages d'infection virale apparaissent en clair dans le tapis coloré en rouge par le rouge neutre. La lecture des résultats par comptage des plages, se fait après 3 jours d'incubation à 37° pour le virus Sindbis et après 4 jours pour le virus vaccinal.

Méthode générale : Synthèse des pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **8a, 10a, 15** et **19**

Une solution aqueuse de 5 mmoles de la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine (**6**) (6) est chauffée à reflux pendant 4 heures avec 10 mmoles de l'amine : (amino-3 didésoxy-3,4β-D,L thréopentopyrannoside de méthyle (**7**) (9) ; amino-3 didésoxy-3,4α-D,L thréopentopyrannoside de méthyle (**9**) (9), trans amino-2 cyclohexanediol-1,3 (**17**) (21), cis hydroxy-2 cyclohexylamine (**14**) (10,11,20) ou piperidine). Après refroidissement, on essore le solide formé et on le recristallise dans le solvant indiqué.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1'β-D,L thréopentopyrannosyl-3')-7 chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine (**8a**)

Ce composé a été obtenu par la méthode générale à partir de l'amine **7** avec un rendement de 47 % ; F = 200° ; s.m. = 297 (10,M^+) ; 166 (60,B) ; 167 (78,B+H) ; 168 (60,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{16}N_3O_3Cl$: C, 52, 43 ; H, 5,37 ; N, 14,11. Trouvé : C 52,18 ; H 5,33 ; N 14,26.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1',β-D,L thréopentopyrannosyl-3')-7 benzylamino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine (**8b**)

Le dérivé chloré **8a** (5 mmoles), en solution dans 30 ml de méthoxy-2 éthanol, est chauffé au reflux pendant 18 heures en présence de 10 mmoles de benzylamine. Le solvant est évaporé sous pression réduite et après addition de 20 ml d'eau, on extrait avec 50 ml de chloroforme. Le produit **8b** cristallise dans le cyclohexane.

Le rendement est de 76 % ; F = 110° ; s.m. = 368 (76,M^+) ; 237 (20,B) ; 238 (99,B+H) ; 239 (58,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{20}H_{24}N_4O_3$ = C, 65,20 ; H, 6,57 ; N, 15,21. Trouvé : C, 65,38 ; H, 6,82 ; N, 15,03.

(Didésoxy-3',4' 0-methyl-1'β-D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 mercapto-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine (**8c**)

Une solution éthanolique (50 ml) de thiourée (15 mmoles) est chauffée à reflux pendant 24 heures en présence de 10 mmoles de **8a**. Le produit **8c** pur est obtenu par recristallisation dans le xylène.

Le rendement est de 51 % ; F = 250° ; s.m. = 295 (5,M^+) ; 164 (29,B) ; 165 (43,B+H) ; 166 (17,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{17}N_3O_3S$: C, 52,88 ; H, 5,76 ; N, 14,23 ; S, 10,84. Trouvé : C, 52,86 ; H, 5,78 ; N, 14,36 ; S, 11,05.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1'β-D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 N pyrrolidino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine (**8d**).

Le composé **8d** a été obtenu dans les mêmes conditions que son analogue **8b**. Le rendement est de 72 %, F = 211° ; s.m. = 332 (52,M^+) ; 201 (17,B) ; 202 (100,B+H) ; 203 (63,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{17}H_{24}N_4O_3$: C, 61,42 ; H, 7,28 ; N, 16,86. Trouvé : C, 61,21 ; H, 7,23 ; N, 16,67.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1' β -D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7-(p-méthylsulfonamidoanilino)-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **8e**

Synthétisé comme **8b** en chauffant pendant 4 heures à reflux, le mélange de **8a** et de la paraméthylsulfonamidoaniline (22), **8e** recristallise dans l'alcool éthylique avec un rendement de 57 %, F > 250° ; s.m. : 447 (18,M+) ; 316 (3,B) ; 317 (19,B+H) ; 318 (12,B+2H) ; 368 (54,M-79) ; (SO_2CH_3=79).

Anal. Calculé pour $C_{20}H_{25}N_5O_5S$: C, 53,69 ; H, 5,59 ; N, 15,65 ; S, 7,15. Trouvé : C, 53,54 ; H, 6,03 ; N, 15,70 ; S, 7,32.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1'β-D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 amino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **8f**

Le composé **8f** a été obtenu par réduction catalytique de **8b** en présence de charbon palladié à 30 % dans l'acide acétique à 50°, avec agitation magnétique pendant 2 jours. Le produit attendu recristallise dans le toluène, avec un rendement de 61 %, F > 250° ; s.m. : 278 (8,M+) ; 147 (27,B) ; 148 (100,B+H) ; 149 (31,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{18}N_4O_3$: C, 56,10 ; H, 6,52 ; N, 20,13. Trouvé : C, 55,79 ; H, 6,33 ; N, 19,78.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1'α-D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **10a**

Ce composé, obtenu à partir de l'amine **9** suivant la méthode générale, a été purifié par cristallisation dans un mélange éthanol-eau (7/3) pour donner des microcristaux incolores.

Rendement 87 %, F = 158° ; s.m. : 297 (31,M+) ; 166 (48,B) ; 167 (88,B+H) ; 168 (53,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{16}N_3O_8Cl$: C, 52,43 ; H, 5,35 ; N, 14,11 ; Cl, 12,01. Trouvé : C, 52,18 ; H, 5,40 ; N, 14,35 ; Cl, 12,07.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1' α -D,L-thréo-pentopyrannosyl-3')-7 amino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **10b**

Obtenu par chauffage à 100° de **10a** (10 mmoles) dans 100 ml de méthanol saturé en ammoniac pendant 24 heures dans un tube scellé, **10b** recristallise dans l'éthanol en microcristaux incolores.

Rendement 80 %, F > 250° ; s.m. : 278 (5,M+) ; 147 (37,B) ; 148 (100,B+H) ; 149 (27,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{18}N_4O_3$: C, 56,10 ; H, 6,52 ; N, 20,13. Trouvé : C, 56,13 ; H, 6,54 ; N, 20,12.

(Didésoxy-3',4' O-méthyl-1'α-D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 méthylamino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **10c**

Ce composé a été obtenu par chauffage de **10a** dans 100 ml de méthylamine aqueuse à 33 %, dans les mêmes conditions que pour former **10b**. Il recristallise dans l'éthanol en aiguilles incolores.

Rendement 85 %, F = 130° ; s.m. : 292 (27,M^+) ; 161 (25,B) ; 162 (100,B+H) ; 163 (27,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{14}H_{20}N_4O_3$, 1/2 H_2O : C, 55,81 ; H, 6,97 ; N, 18,60. Trouvé : C, 56,07 ; H, 7,27 ; N, 18,70.

(Didésoxy-3',4' O-méthyl-1' α-D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 benzylamino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **10d**

Ce composé a été formé à partir de **10a**, dans les conditions décrites pour la synthèse de **8b**. Après cristallisation dans l'éthanol, il se présente en microcristaux incolores.

Rendement 92 %, F = 195°, s.m. : 368 (10,M^+) ; 237 (8,B) ; 238 (28,B+H) ; 239 (10,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{20}H_{24}N_4O_3$: C, 65,20 ; H, 6,57 ; N, 15,21. Trouvé : C, 64,98 ; H, 6,48 ; N, 15,20.

(Didésoxy-3',4' O-méthyl-1' α -D,L-thréopentopyrannosyl-3')-7 pyrrolidino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **10e**

Ce composé a été obtenu à partir de **10a** et de pyrollidine, dans les conditions décrites pour la synthèse de **10b** et purifié par recristallisation dans l'éthanol.

Rendement 73 %, F = 138° ; s.m. : 332 (17,M^+) ; 201 (25,B) ; 202 (50,B+H) ; 203 (16,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{17}H_{24}N_4O_3$, 1/2 H_2O : C, 59,82 ; H, 7,33 ; N, 16,42. Trouvé : C, 60,08 ; H, 7,43 ; N, 16,41.

(Didésoxy-3',4' O-méthyl-1' β -D,L-érythropentopyrannosyl-3')-7 chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **12a**

Une solution de de 7,5 g (36,5 mmoles) de la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine **6** dans le méthoxy-2 éthanol (50 ml) en présence de 5,4 g (36,7 mmoles) d'amino-3, didésoxy-3,4, β-D,L-érythropentopyrannoside de méthyle **11** et d'un excès de tributylamine (7,5 g) est chauffée à reflux pendant 2 heures. Après évaporation du solvant sous pression réduite et deux recristallisations dans l'éthanol, on obtient **12a** pur.

Rendement 55 %, F = 140° ; s.m. : 297 (5,M^+) ; 166 (22,B) ; 167 (30,B+H) ; 168 (19,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{16}N_3O_3Cl$: C, 52,43 ; H, 5,47 ; N, 14,11 ; Cl, 12,01. Trouvé : C, 52,33 ; H, 5,39 ; N, 13,85 ; Cl, 12,25.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1' β-D,L-érythropentopyrannosyl-3')-7 amino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **12b**

Ce produit a été obtenu à partir de **12a** dans les conditions décrites pour synthétiser **10b**.

Rendement 72 %, F 250° ; s.m. : 278 (6,M+) ; 147 (10,B) ; 148 (33,B+H) ; 149 (12,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{18}N_4O_3$: C, 56,10 ; H, 6,52 ; N, 20,13. Trouvé : C, 55,81 ; H, 6,60 ; N, 20,20.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1' β-D,L-érythropentopyrannosyl-3')-7 benzylamino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **12c**

Obtenu à partir de **12a** dans les conditions décrites pour synthétiser **8b**, **12c** recristallise dans l'éthanol.

Rendement 63 %, F = 172° ; s.m. : 368 (5,M+) ; 237 (5,B) ; 238 (16,B+H) ; 239 (5,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{20}H_{24}N_4O_3$: C, 65,20 ; H, 6,57 ; N, 15,21. Trouvé : C, 64,94 ; H, 6,56 ; N, 15,36.

(Didésoxy-3',4' 0-méthyl-1' β-D,L-érythropentopyrannosyl-3')-7 N-piperidino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **12d**

Obtenu à partir de **12a** et de piperidine dans les mêmes conditions que le composé précédent, **12d** recristallise dans l'éthanol en microcristaux incolores.

Rendement 60 %, F = 146° ; s.m. : 346 (12,M+) ; 215 (6,B) ; 216 (33,B+H) ; 217 (9,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{18}H_{26}N_4O_3$: C, 62,40 ; H, 7,56 ; N, 16,17. Trouvé : C, 62,13 ; H, 7,57 ; N, 16,45.

Chloro-4 acétonyl-5 (cis-hydroxy-2' cyclohexylamino)-6 pyrimidine **15**

Après la condensation de l'amine **14** effectuée suivant la méthode générale décrite, le produit **15** a été purifié sur colonne de silice (30 x 1 cm) éluée avec le mélange acétate d'éthyle-éthanol 9-1 (V/V). Il recristallise dans l'hexane en microcristaux incolores.

Rendement 20 %, F = 118° ; s.m. : 283 (4,M+) ; 266 (11,M-OH) ; 248 (44,M-Cl) ; 240 (16,M-$COCH_3$) ; 226 (9,M-CH_2COCH_3) ; i.r.ν(KBr) cm^{-1} : 1760 (C=O). rmn ^1H (DMSOd6) ; 8,19 (s,1,H2) ; 6,45 (d,1,NH) ; 4,58 (d,1,OH) ; 4,10-3,78 (m,4,H1',H2',CH_2) ; 3,88 (CH_2) ; 2,20 (s,3,$COCH_3$) ; 1,85-1,15 (m,8,H3',H4',H5',H6').

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{18}N_3O_2Cl$: C,55,02 ; H, 6,34 ; N, 14,81 ; Cl, 12,52. Trouvé : C, 55,31 ; H, 6,40 ; N, 14,89 ; Cl, 12,82.

(Cis hydroxy-2' cyclohexyl-1')-7 chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **16**

Le composé **15** est chauffé à reflux dans le méthoxy-2 éthanol pendant 4 h pour donner le produit **16** qui recristallise dans un mélange eau-éthanol, en paillettes

incolores.

Rendement 50 %, F = 114° ; s.m. : 265 (38,M^+) ; 166 (33,B) ; 167 (100,B+H) ; 168 (49,B+2H).

rmn ^1H (DMSOd6) :δ8,51 (S,1,H2) ; 6,39 (qnr,1,H5) ; 5,04 (d,1,OH,JOH-H2'=4,2 Hz) ; 4,72 (2t,1,H1',JH1'ax-6'ax = 12,5 Hz) ; 3,96 (m,1,H2') ; 2,89 (q,1,H6'ax) ; 2,61 (d,3,CH_3) ; 1-2 (m,7,H3',H4',H5',H6'eq).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{16}N_3OCl$: C, 58,75 ; H, 6,02 ; N, 15,81. Trouvé : C, 59,01 ; H, 5,99 ; N, 16,02.

(Trans dihydroxy-2',6' cyclohexyl-1')-7 chloro-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **19a**

Obtenu suivant la méthode générale, à partir de **17**, ce composé recristallise dans l'eau en microcristaux incolores.

Rendement 82 %, F $>$ 250° ; s.m. : 281 (60,M^+) ; 166 (15,B) ; 167 (100,B+H) ; 168 (38,B+2H).

rmn ^1H (DMSOd6) : δ 8,49 (s,1,H2) ; 6,36 (qnr,1,H5, JH5-CH_3=0,8 Hz) ; 4,73 (d,2,OH, JOH-H2'=JOH-H6'=6 Hz) ; 4,52 (m,2,H2' et H6') ; 3,67 (t,1,H1',JH1'-H2'=JH1'-H6'= 9,6 Hz) ; 2,45 (dnr,3,CH_3) ; 1,96-1,21 (m,6,H3',H4',H5').

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{16}N_3O_2Cl$: C, 55,41 ; H, 5,68 ; N, 14,92. Trouvé : C, 55,67 ; H, 5,63 ; N, 14,62.

(Trans dihydroxy-2',6' cyclohexyl-1')-7 hydroxy-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **19b**

L'oxo-4 acétonyl-5 chloro-6 pyrimidine **13** (6) (1,865 g) en solution dans 50 ml de méthoxy-2 éthanol est chauffée à reflux pendant 30 h en présence de 2,62 g de trans amino-2 cyclohexane diol-1,3 (21). Le produit **19b** recristallise dans l'éthanol en cristaux incolores.

Rendement 45 %, F $>$ 250° ; s.m. : 263 (23,M^+) ; 148 (26,B) ; 149 (100,B+H) ; 150 (19,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{13}H_{17}N_3O_3$: C, 59,30 ; H, 6,51 ; N, 15,96. Trouvé : C, 59,08 ; H, 6,54 ; N, 15,89.

(Trans dihydroxy-2',6' cyclohexyl-1')-7 N-pipéridino-4 méthyl-6 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine **19c**

Ce composé a été obtenu à partir de **19a** et de pipéridine dans les conditions décrites pour la synthèse de **8b**. Il recristallise dans l'éthanol en microcristaux incolores.

Rendement 80 %, F = 234° ; s.m. : 330 (4,M^+) ; 215 (33,B) ; 216 (100,B+H) ; 217 (0,B+2H).

Anal. Calculé pour $C_{18}H_{26}N_4O_2$: C, 65,43 ; H, 7,93 ; N, 16,96. Trouvé : C, 65,30 ; H, 8,07 ; N, 16,93.

N-pipéridino-4 acétonyl-5 chloro-6 pyrimidine **18**

Ce composé (F = 95°) a été préparé dans les conditions déjà décrites (6).

B) ACTIVITE BIOLOGIQUE

a) Activité antivirale* in vitro

On utilise la méthode des plages en milieu gélosé de Dulbecco. Les virus déterminent l'apparition de plages de nécrose dans une monocouche de cellules recouvertes par un milieu gélosé.

Les cellules utilisées sont des cellules d'embryons de poulet, cellules de première explantation.

Les virus testés sont le virus de la vaccine, Poxvirus à ADN bicaténaire et le virus Sindbis, Togavirus à ARN monocaténaire.

Les produits à tester sont incorporés au milieu gélosé après infection des cellules, ce qui permet de déterminer une activité thérapeutique.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du développement viral et on détermine une dose efficace 50 %.

Les produits sont dissous dans le méthanol pur : la plus forte concentration testée contient 1 % de méthanol, ce qui n'influe pas sur le développement viral.

Le produit antiviral de référence était la Ribavirine (Virazole ICN 1219), produit antiviral à large spectre actif contre de nombreux virus à ARN et à ADN.

Résultats

Les résultats de l'activité antivirale in vitro sont réunis dans les Tableaux I et II.

On peut voir que le produit **12d** montre une activité similaire à celle de la Ribavirine vis-à-vis du virus de la Vaccine, les deux autres produits étant un peu moins actifs.

Le produit **12d** est également actif à une dose cependant plus élevée contre le virus Sindbis, alors que la Ribavirine s'est montrée inactive contre ce virus à ARN.

* Cette étude a été réalisé dans les laboratoires Sarbach

TABLEAU I

Activité contre le virus de la vaccine

	Concentrations testées µg/ml	Pourcentage d'inhibition 1er essai	2ème essai
Ribavirine ou Virazole	100		
	50	100	99,6
	25	100	82,8
	12,5	42,5	39,4
	6,25	17	14,7
	3,125		16,2
	DE 50	11,85 µg/ml (4,8 - 29,4)	14,3 µg/ml (5,8 - 34,9)
IDU (5 iodo 2) deoxyuridine	2,5		100
	1,25		100
	0,625		100
	0,312		95,5
	DE 50		non calculable
8a	51,4	0	
	12,7	0	
	3,2	0	
8b	147	100	
	73	50	
	36	0	
8c	59	0	
	15	0	
	3,7	0	
8d	33	50	
	16,6	18	
	4	0	
8e	89	0	
	22	0	
	5	0	
10b	100	100	
	50	52,5	
	25	14,14	
	12,5	0	
	6,25	0	
	DE 50	41,9 µg/ml (19,1 - 92,2)	

10d	100	100	
	50	87,9	
	25	18,7	
	12,5	7,1	
	6,25	4,04	
	DE 50	29,45 µg/ml (13,2 - 65,4)	
12a	100	97,5	
	50	47,8	
	25	21,5	
	12,5	5,8	
	6,25	16,6	
	3,125		
	DE 50	41,4 µg/ml (17,1 - 100,2)	
12c	100	100	
	50	100	
	25	47,4	
	12,5	0,5	
	6,25	4,7	
	3,124		
	DE 50	25,2 µg/ml (11,8 - 53,8)	
12d	100	cytotoxique	cytotoxique
	50	100	100
	25	100	97,7
	12,5	22,9	61,8
	6,25	2,3	28,3
	3,125		
	DE 50	14,1 µg/ml (6,5 - 30,4)	9,64 µg/ml (3,3 - 27,9)

TABLEAU II

Activité contre le virus Sindbis (Alphavirus)

	Concentration testée µg/ml	Pourcentage d'inhibition 1er essai	2ème essai
Ribavirine	200		0
	100	11,4	0
	50	17,4	0
	25	16,6	0
	12,5	20,4	0
	6,25	7,6	
10a	200	11,3	
	100	10,5	
	50	12,5	
	25	9	
	12,5	15,8	
	6,25	19,2	
10c	200	15,4	
	100	14,7	
	50	10,5	
	25	20,1	
	12,5	8,2	
10e	200	10,5	
	100	20,8	
	50	0	
	25	0	
	12,5	1,2	
	6,25	1,4	
12d	100		100
	50	91,6	23
	25	6,8	0
	12,5	0	0
	6,25	0	0
	3,125	0	
	DE 50		56,6 µg/ml (26,6 - 120)
12a	50	23,5	
	25	5,3	
	12,5	12,1	
	6,25	0	
	3,125	7,6	
	DE 50		
12c	100	99,2	
	50	0	
	25	0	
	12,5	0	
	6,25	0	
	3,125	0	
	DE 50		

Aux concentrations non toxiques, les composés **10c**, **12c** et **12d** (**10c** : 50 µg/ml; **12c** : 1,5 µg/ml ; **12d** : 25 µg/ml) se sont avérés inactifs vis-à-vis des virus suivants : rhinovirus R1112 et RV3, virus de l'herpès type I, virus Caxsackie A21, adenovirus 7 et virus parainfluenza (tous cultivés dans des cellules MRC5). Les mêmes produits ont été trouvés inactifs vis-à-vis du virus grippal AWSN et d'un coronavirus (cellumes MDCK) ainsi que vis-à-vis du virus de Semliki Forest (cellules L).

Il apparait donc que les nouveaux nucléosides étudiés présentent une activité antivirale très spécifique d'un nombre limité de souches virales. Cette spécificité est difficile à interpréter et nécessite donc une étude de leur mécanisme d'action.

Ces essais ont été réalisés par Mr. A. Zerial, Service Santé Rhone-Poulenc, Centre Nicolas Grillet, Vitry-sur-Seine que je remercie

b) Etudes antivirales in vivo

Nous avons recherché ensuite l'action du produit **12d** sur la formation de lésions sur la queue de souris infectées par le virus de la vaccine.

- Souris mâles 20-21 g Swiss
- Virus de la vaccine

Injection par voie intraveineuse sous 0,1 ml et comptage des lésions 7 jours après infection.

- Traitement

Les produits sont administrés quotidiennement pendant 5 jours en commençant 5 heures après infection, par voie intrapéritonéale ou voie orale sous 0,2 ml.

Les produits de référence utilisés sont la Méthisazone administrée par voie orale et la Ribavirine administrée par voie intrapéritonéale.

Résultats

Ils sont résumés dans le Tableau III.

Dans nos essais seule la Méthisazone s'est révélée active de façon significative.

La Ribavirine n'était pas active à 50 mg/kg, bien que Declercq la trouve à 20 mg/kg, en commençant le traitement immédiatement après infection.

Le produit **12d** n'a pu être testé à une concentration supérieure à 50 mg/kg du fait de la faible quantité dont nous disposions. On trouve une certaine activité par voie orale bien que non significative. La voie intrapéritonéale n'a pas donné d'activité.

TABLEAU III

	Dose mg/kg/j	Nombre moyen de lésions ± SEM	Pourcentage inhibition	
Témoin infection		7 ± 2		
	50 mg/kg VO x 4 fois	4,2 ± 2,1	40	NS
	25 mg/kg VO x 4 fois	4,9 ± 3,1	30	NS
	50 mg/kg IP x 5 fois	10,6 ± 7,4		
	25 mg/kg IP x 5 fois	7,3 ± 3,8	0	NS
Ribavirine	50 mg/kg IP x 5 fois	7,2 ± 3,2	0	NS
	25 mg/kg IP x 5 fois	5,6 ± 4	20	NS
Méthisazone	50 mg/kg VO x 5 fois	4 ± 3	43	$P < 0,05$ S
Témoin infection + méthanol 1/12,5 IP x 5		6,8 ± 3,8	3	NS

C) ACTION ANTITUMORALE DU PRODUIT **12d**

L'action antitumorale du **12d** a été recherchée chez la souris black de sexe mâle, porteuse en sous-cutanée du mélanome B16 (animaux fournis par Monsieur Christian VOULOT).

Le **12d** a été administré en sous-cutanée à la dose de 1 mg/10 g de poids vif, quotidiennement pendant 16 jours à 12 souris ; le **12d** a été dissous dans du labrafil* (1,5 mg dans 0,1 ml). Les injections du **12d** ont débuté le jour même de l'implantation tumorale. Les 12 animaux servant de témoins mélanome ont reçu des injections sous-cutanées de labrafil dans des conditions équivalentes aux traités **12d**.

Les contrôles ont intéressé :

- l'évolution pondérale (pesée hebdomadaire des animaux),
- l'évolution tumorale, par la mesure de deux axes perpendiculaires du mélanome,
- le temps de survie

Une étude statistique des résultats (test "t" de Student) a été conduite sur les moyennes et les écarts types des valeurs obtenues.

*Etudes effectuées : Etablissements GATTEFOSSE, 36 Chemin de Genas, 69800 ST PRIEST

1) Evolution pondérale

Le **12d** ne modifie pas de façon significative la prise de poids (Tableau 1). Les pourcentages de variation (Jour 1/Jour 14) sont de +6 et +10 % respectivement pour les témoins et les traités **12d**.

Poids (grammes)	J 1	J 7	J 14
Témoins	15,6 $^{+}$ 3,2	15,4 $^{+}$ 2,4	16,5 $^{+}$ 3,4
Traités **12d**	17,5 $^{+}$ 4,3	18,9 $^{+}$ 3,3	19,3 $^{+}$ 3,4

Tableau 1. Evolution pondérale de souris black porteuses du mélanome B 16, témoins et traitées **12d** (1 mg/10 g de poids vif/SC quotidiennement).

2) Evolution tumorale

Le **12d** n'affecte pas la croissance du mélanome B 16 (Tableau 2). Le calcul, au jour 16, de la surface tumorale formée, par gramme de poids corporel ne fait pas apparaître de différence :

- 13,9 mm^2/gramme chez les témoins
- 14 mm^2/gramme chez les traitées **12d**.

Moyenne taille tumeur (mm^2)	J 12	J 16
Témoins	113,5 $^{+}$ 68	227 $^{+}$ 71
Traités **12d**	132 $^{+}$ 69	274 $^{+}$ 68

Tableau 2. Evolution tumorale (moyenne $^{+}$ écarts types de la taille des tumeurs) chez les souris mélanome témoins et traitées **12d** (1 mg/10 g de poids vif/SC quotidiennement).

3) Temps de survie

Le **12d** ne modifie pas la survie des animaux traités par rapport aux témoins (Tableau 3).

Temps de survie (jour)	Témoins mélanome	Traités **12d**
Moyenne $^{+}$ écarts types	26,1 $^{+}$ 6,5	25,2 $^{+}$ 6,4

Tableau 3. Temps de survie (moyenne $^{+}$ écarts types) de souris black porteuses en sous-cutanée du mélanome B 16, témoins et traitées **12d** (1 mg/10 g de poids vif/SC quotidiennement).

Conclusions

Dans nos conditions expérimentales, le **12d** n'a pas présenté d'effet antitumoral vis-à-vis du mélanome B 16 de la souris black ; la croissance tumorale et le temps de survie ne sont pas affectés.

La pharmacocinétique du **12d** au sein de l'excipient utilisé (labrafil) et avec la voie d'administration choisie (sous-cutanée) n'est pas connue. De ce fait, nous ne savons pas si l'imprégnation médicamenteuse a été suffisante.

C'est pourquoi on ne peut totalement exclure une action antitumorale du **12d** dans le cas où il serait employé au sein d'un autre vecteur, et (ou) en utilisant une autre voie d'administration (intrapéritonéale par exemple).

N.B. : Il est nécessaire de rappeler ici que des études antérieures nous ont permis de constater la particulière résistance du mélanome B 16 de la souris black à des traitements, pour lesquels d'autres types de tumeurs sont affectées (champ magnétique sur le lymphome de la souris, par exemple).

BIBLIOGRAPHIE ET NOTES

(1) Cette étude a bénéficié d'un contrat de recherche libre de l'INSERM : CRL N° 813 013.

(2) E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer and A. Holy. Science 200, 563 (1978).

(3) G.B. Elion, P.A. Furman, J.A. Fyje, P. De Mirande, L. Beauchamps and H.J. Schaeffer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5716 (1977).

(4) R. Vince and S. Daluge. J. Med. Chem. 20, 612 (1977).

(5) R.J. Suhadolnik. Nucleosides as Biological Probes, John Wiley and Sons, New York (1979).

(6) E. Bisagni, J.P. Marquet et J. André-Louisfert. Bull. Soc. Chim. France, 4338 (1969).

(7) J.P. Marquet, L. Montagnier, J. Gruest, J.D. Bourzat, J. André-Louisfert et E. Bisagni. Chim. Ther. 6, 427 (1971).

(8) E. Bisagni, J.P. Marquet et J. André-Louisfert. Bull. Soc. Chem. France, 1483 (1972).

(9) D. Descours, D. Anker, J.Y. Sollaud, J. Legheand, H. Pacheco et M. Chareire. Eur. J. Med. Chem. 14, 67 (1979).

(10) E. Herranz and K.B. Sharpless. J. Org. Chem. 43, 2544 (1978).

(11) K.B. Sharpless, A.O. Chong and K. Oshima. J. Org. Chem. 41, 177 (1976).

(12) M.L. Martin et G.J. Martin. Manuel de Résonance Magnétique Nucléaire. Azoulay, Editeurs (1971).

(13) G. Descotes, F. Chizat et J.C. Martin. Bull. Soc. Chim. France, 2304 (1970).

(14) L.D. Hall. Tetrahedron Lett., 1457 (1964).

(15) M.F. Grenier-Loustalot, A. Lectard et F. Metras. Org. Magn. Reson. 7, 276 (1975).

(16) M.F. Grenier-Loustalot, A. Lectard et F. Metras. ibid. 7, 628 (1975).

(17) A. Saroli, D. Descours, D. Anker et H. Pacheco. J. Het. Chem., 765 (1978).

(18) R.U. Lemieux et B. Fraser-Reid. Can. J. Chem. 43, 1460 (1965).

(19) R. Dulbecco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 747 (1952).

(20) L. Goodman. Adv. Carbohyd. Chem. 22, 109 (1967).

(21) T. Suami, Y. Sato, Y. Fukai and Y. Sakota. J. Het. Chem. 6, 663 (1969).

(22) G.T. Morgan and J.A. Pickard. J. Chem. Soc. 97, 61 (1970).

(23) Nous remercions M.M.C. Bosso (CERMAV, Grenoble, France) pour l'enregistrement des spectres de masse.

CONCLUSION

Généralités

Les activités biologiques des nucléosides naturels et synthétiques connues sont très diverses et nombreuses. Les structures actives sont également très variées et impliquent des modifications plus ou moins complexes des nucléosides fondamentaux présents dans les acides nucléiques.

Pour notre part, nous avons entrepris de synthétiser un certain nombre de nucléosides apparentés à la formycine, la tubercidine, l'aristéromycine et la puromycine. Par rapport à l'adénosine, ces analogues naturels comportent déjà, soit une base modifiée (formycine et tubercidine), soit un sucre modifié (aristéromycine), soit à la fois, une base et un sucre modifiés (puromycine). Sur ces nucléosides, pris comme modèles, nous avons choisi d'introduire des modifications supplémentaires ou de combiner plusieurs modifications structurales qui n'avaient pas encore été effectuées.

Ce travail se situe dans le contexte général de la recherche d'antimétabolites nucléosidiques à activité antitumorale ou antivirale. En effet, de nombreux laboratoires de recherche, principalement aux Etats-Unis et au Canada, se consacrent à l'étude des relations entre la structure et l'activité biologique de composés nucléosidiques modèles, naturels ou synthétiques, dans le but d'augmenter leur(s) activité(s) biologique(s), de réduire leur toxicité, ou de découvrir de nouvelles activités.

Nous avions choisi délibérément de diversifier notre approche du sujet en effectuant des variations de structure à la fois sur le sucre et la base. De cette façon, nous espérions, au moment de commencer ce travail, qu'il était possible de dissocier l'effet biologique recherché de l'effet toxique indésirable. En effet, de nombreux nucléosides présentent des propriétés antivirales ou antitumorales mais leur utilisation en chimiothérapie humaine est souvent limitée en raison de leur toxicité, justifiant ainsi la recherche de nouvelles structures.

Chimie

1) Une nouvelle famille de C-nucléosides comportant une s-triazolo [4,3-b] pyridazine (noyau isostère du noyau purine) substituée en position 3 par un D-ribofurannose a été obtenue. La chloro-3 hydrazino-6 pyridazine réagit sur le chlorhydrate du (O-benzoyl-5 D-ribofurannosyl-1) thioformimidate de benzyle, intermédiaire de choix, déjà utilisé pour synthétiser d'autres C-nucléosides, en donnant le produit attendu. Le chlore en position 6 de la s-triazolo [4,3-b] pyridazine formée est très réactif et peut être facilement substitué par des amines primaires ou secondaires. Par contre, la substitution par l'ammoniac est difficile parce que la solvolyse est la réaction prédominante.

En ce qui concerne la structure, la comparaison des temps de relaxation du proton H1' des anomères α et β, séparés par chromatographie, permet de déterminer leur configuration anomérique sans ambiguité :

2) Nous avons mis au point une nouvelle synthèse des s-triazolo [4,3-d] triazines-1,2,4 et s-triazolo [1,5-d] triazines-1,2,4 à partir de triazoles 1,2,4 disubstitués 3,5. En effet, les triazoles 1,2,4 carboxyhydrazide-5 sont cyclisés par l'orthoformiate d'éthyle pour donner un mélange des deux isomères triazolo-triazines selon que cette cyclisation s'effectue sur l'azote 4 ou 1 du triazole.

L'identification de ces deux noyaux est fondée essentiellement sur la mesure des temps de relaxation du proton H5 et sur les déplacements chimiques du carbone 13.

Bien que nous n'ayions réussi à obtenir aucun C-nucléoside correspondant à ces noyaux, nous avons ouvert une voie d'accès à ces deux nouveaux hétérocycles.

3) Nous avons mis en évidence un nouveau réarrangement des aza-5-indoles en aza-7-indoles et vice versa. Cette réaction permet de synthétiser des aza-5 ou aza-7 indoles, diversement substitués sur leurs positions 1 et 4. Certains de ces dérivés étaient difficilement accessibles par les méthodes connues et sont intéressants en raison de l'importance biologique du noyau indole et de ses dérivés (alcaloïdes indoliques, antibiotiques, etc) mais nous n'avons malheureusement pas, jusqu'à maintenant, réussi à construire les nucléosides correspondants.

Cependant, nous avons pu définir les conditions de ce réarrangement et proposer un mécanisme réactionnel pour l'expliquer.

4) Nous avons réussi à synthétiser deux nouveaux analogues de puromycine comportant une diméthylamino-4 pyrrolo [2,3-d] pyrimidine et un cyclopentane aminé condensé sur un reste de O-méthyl-tyrosine comme dans la puromycine. Ces produits inhibent la croissance des cellules tumorales de Friend en culture à la concentration de 0,1 mM (71,3 % et 48,2 % d'inhibition pour les deux diastéréoisomères). Ce premier résultat justifie le travail de synthèse réalisé et indique que les nucléosides carbocycliques aminés, substitués par un reste d'acide aminé, relativement peu étudiés jusqu'à présent, mériteraient une étude détaillée des relations entre leur structure et leur activité.

5) Nous avons synthétisé trois analogues de tubercidine comportant en position 7 un substituant cyclopentanique analogue du ribose, du lyxose ou de l'arabinose à la place du ribose présent dans la tubercidine.

Une étude conformationnelle de ces produits en solution dans le $DMSOd_6$ par RMN du proton à 100 MHz a été réalisée. Elle a montré que les analogues carbocycliques qui comportent un OH 2' ou 3' cis, présentent une conformation syn stabilisée par une liaison hydrogène entre le OH et l'azote-1 de la base.

Cet effet est d'autant plus marqué qu'il existe sur la position 4 un substituant donneur d'électrons qui augmente la basicité de l'azote-1. L'analyse des constantes de couplage des protons du carbocycle ainsi que l'étude de l'effet Overhauser nucléaire entre H1' et le méthyle-6 de la base sont tout à fait compatibles avec cette conclusion.

6) Enfin, nous avons synthétisé une série de pseudonucléosides qui comportent une pyrrolo [2,3-d] pyrimidine substituée en 7 par différents pentapyrannoses ou restes cyclohexyles en faisant réagir sur la dichloro-4,6 acétonyl-5 pyrimidine, une amine primaire dans l'eau à ébullition. Généralement, la pyrimidine monosubstituée se cyclise immédiatement en pyrrolo [2,3-d] pyrimidine. Toutefois, cette réaction de substitution-cyclisation ne s'effectue pas dans l'eau si l'amine utilisée possède un hydroxyle cis en position adjacente. Dans ce dernier cas, il est possible d'isoler le composé de substitution intermédiaire et la cyclisation est obtenue au reflux d'un solvant à point d'ébullition plus élevé que l'eau, comme l'éther monométhylique de l'éthylène glycol.

L'analyse des différentes constantes de couplage du proton indique que la base se met généralement en position équatoriale.

Plusieurs produits de cette série se sont montrés actifs contre le virus de la vaccine cultivé dans des cellules d'embryon de poulet. Le plus actif d'entre eux a une DE 50 de 9,6 µg/ml sur le virus de la vaccine et de 56,6 µg/ml sur le virus sindbis.

Discussion et Perspectives

Jusqu'à présent, la recherche de nucléosides antiviraux ou antitumoraux a souvent été assez empirique. Elle a permis néanmoins d'acquérir de nombreuses molécules actives et d'accumuler un certain nombre de données sur les relations entre la structure et les propriétés biologiques et pharmacologiques de ce type de composé. De plus en plus, grâce à l'exploitation de ces données, on assiste maintenant à des tentatives de rationalisation.

C'est dans ce contexte que nous avons effectué la synthèse d'analogues carbocycliques de la tubercidine. On sait que la tubercidine n'est pas dégradée par les enzymes du catabolisme des nucléosides que sont l'adénosine désaminase et la purine nucléoside phosphorylase, propriété en soi intéressante. Malheureusement, c'est aussi un composé très toxique, aussi bien pour les cellules saines que pour les cellules tumorales (DE_{50} = 0,5 ng/ml sur L1210). Dans la mesure où il est concevable de dissocier l'effet cytotoxique des autres propriétés biochimiques et antitumorales, on pouvait espérer

obtenir une telle dissociation en remplaçant le ribose de la tubercidine par un cyclopentane fonctionnalisé, simulant le ribose. Mais nous n'avons pas obtenu le résultat escompté. Au contraire, avec des changement structuraux plus importants comme dans le cas des analogues de puromycine, modifiés à la fois sur la base et le sucre, on retrouve une activité inhibitrice sur les cellules de la leucémie de Friend en culture.

Quant aux C-nucléosides que nous avons synthétisé, ils comportent des modifications seulement au niveau de la base et n'ont manifesté aucune activité biologique ni sur les cellules ni sur les virus.

Enfin, avec les pseudonucléosides, le ribose de la tubercidine a été remplacé par un substituant pentopyrannosique (cycle à 6 centres) dont la structure est beaucoup plus éloignée d'un ribose que dans le cas des nucléosides carbocycliques. Pourtant, plusieurs composés de cette série présentent une très bonne activité contre le virus de la vaccine et une petite activité contre le virus sindbis. C'est un résultat intéressant dans la mesure ou cette activité antivirale semble être très spécifique du virus vaccinal (puisque aucun des huit autres virus étudiés n'est sensible à ces produits) et aussi parce que ces produits sont très peu cytotoxiques, ce qui implique un indice thérapeutique élevé. Ces trois exemples (nucléosides carbocycliques, analogues carbocycliques de puromycine et pseudonucléosides) illustrent la difficulté de notre approche puisque les structures les plus proches du modèle tubercidine sont inactives alors que des structures plus éloignées du modèle sont actives.

Cette étude de nouveaux analogues de nucléosides n'est qu'une première approche. Les modifications structurales possibles restent nombreuses. Elles permettront sans doute, de découvrir d'autres produits actifs. A cet égard, les nucléosides représentent une famille de composés qui, malgré les nombreux travaux qui leur ont déjà été consacrés, restent extrêmement prometteuse. Mais, dans l'état actuel de nos connaissances, la recherche de produits sélectivement toxiques vis-à-vis de certaines cellules (tumorales ...) ou de virus pathogènes (Herpes...) ne semble pas vraiment rationalisable. Tout au plus, peut-on noter qu'avec l'acyclovir et quelques uns de ses dérivés synthétisés récemment, qui sont de puissants antiviraux très peu toxiques pour les cellules hôtes, une nouvelle classe de produits antiviraux a été inaugurée. Pour ce qui nous concerne, nous avons montré que le remplacement du ribose de la tubercidine par un cyclopentane (comme dans l'aristéromycine) ou par un pentopyrannose diminue considérablement la toxicité par rapport au modèle tubercidine et peut faire apparaître des propriétés antivirales spécifiques.

Ces résultats montrent que les analogues carbocycliques de nucléosides méritent d'être étudiés et nous incitent à poursuivre dans cette direction.

Cette thèse comprend les 6 articles suivants :

- Synthesis of s-triazolo [4,3-b] pyridazine C-nucleosides.
  Michel Legraverend, Emile Bisagni et Jean-Marc Lhoste
  Journal of Heterocyclic Chemistry 18 (1981), 893-898.

- Synthèse de s-triazolo [4,3-d] et [1,5-d] triazines 1,2,4.
  Michel Legraverend, Jean-Marc Lhoste et Emile Bisagni
  Tetrahedron 37 (1981), 4353-4356.

- Carbocyclic analogs of 6-methyl-tubercidin.
  Michel Legraverend, Jean-Marc Lhoste, Jean-Marie Bechet et Emile Bisagni
  European Journal of Medicinal Chemistry (Chimica Therapeutica) 18 (1983), 269-272.

- Conformational studies of some carbocyclic nucleoside analogs.
  Michel Legraverend, Jean-Marc Lhoste et E. Bisagni
  Tetrahedron (sous presse).

- New heterocyclic rearrangement : transformation of 1-substituted 4-(alkylamino)-(1H)-pyrrolo [3,2-c] pyridines into 1-substituted 4-(alkylamino)-(1H)-pyrrolo [2,3-b] pyridines (5-aza to 7-azaindoles).
  Emile Bisagni, Michel Legraverend et Jean-Marc Lhoste
  Journal of Organic Chemistry 17 (1982), 1500-1503.

- Pseudo-nucléosides dérivés des pyrrolo [2,3-d] pyrimidines. Synthèse et activité biologique.
  Michel Legraverend, Emile Bisagni, Jean-Marc Lhoste, Daniel Anker et Henri Pacheco
  Journal of Heterocyclic Chemistry 20 (1983), 925-929.

LEGRAVEREND Michel

Sujet : Synthèse et étude d'analogues de nucléosides

RESUME

Sur des nucléosides modèles qui sont déjà des analogues de l'adénosine (formycine, tubercidine, aristéromycine et puromycine), nous avons choisi d'introduire des modifications supplémentaires ou de combiner plusieurs changements structuraux dans le but d'obtenir des produits moins toxiques que les modèles.

Cette recherche nous a permis de mettre en évidence des conformation syn bloquées pour certains analogues carbocycliques de tubercidine.

Nous avons par ailleurs découvert un nouveau réarrangement en série hétérocyclique aza-indolique.

Nous avons montré que le remplacement du ribose de la tubercidine par un cyclopentane ou un pyrannose diminue considérablement la toxicité par rapport dèle tubercidine et peut faire apparaître des propriétés antivirales spécifiques.

'S

Nucléosides (analogues), s-triazolo [4,3-b] pyridazines (C-nucléosides), [4,3-d] et [1,5-d] triazines-1,2,4, , tubercidine (carbocyclique), ent (aza-indoles), antiviraux (vaccine, sindbis).